

Aus dem Institut für Versuchstierkunde, Versuchstierkrankheiten,
Biometrie, Dokumentation und Versicherungsveterinärmedizin;
Fachrichtung Versuchstierkunde und Versuchstierkrankheiten
der Freien Universität Berlin

Natürliche Antikörper
bei verschiedenen Rattenstämmen
unter besonderer Berücksichtigung
der Xenohämolysinaktivität
gegen Meerschweinchenerythrozyten
in Abhängigkeit von Alter und Umwelt

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Jörg Jänicke
Tierarzt aus Berlin

Berlin 1976
Journal-Nr. 897

Aus dem Institut für Versuchstierkunde, Versuchstierkrankheiten,
Biometrie, Dokumentation und Versicherungsveterinärmedizin;
Fachrichtung Versuchstierkunde und Versuchstierkrankheiten
der Freien Universität Berlin

**Natürliche Antikörper
bei verschiedenen Rattenstämmen
unter besonderer Berücksichtigung
der Xenohämolysinaktivität
gegen Meerschweinchenerythrozyten
in Abhängigkeit von Alter und Umwelt**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Jörg Jänicke
Tierarzt aus Berlin

Berlin 1976
Journal-Nr. 897

Gedruckt mit Genehmigung
des Fachbereiches Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Vorsitzender des FBR: Prof. Dr. H.H. Frey

Referent: Prof. Dr. M. Merckenschlager

Korreferent: Prof. Dr. E. Hellmann

Tag der Promotion: 1.10. 1976



	Inhaltsverzeichnis	Seite
1	Einleitung	1
2	Literaturübersicht	2
2.1	"Natürliche" Antikörper	2
2.1.1	Definitionen der "natürlichen" Antikörper	2
2.1.2	Vorstellungen zur Induktion "natürlicher" Antikörper	3
2.1.3	Struktur der "natürlichen" Antikörper	9
2.1.4	"Natürliche" Antikörper in der Phylogenese	14
2.1.5	"Natürliche" Antikörper in der Ontogenese	15
2.2	"Natürliche" Antikörper bei der Ratte	17
3	Eigene Untersuchungen	20
3.1	Material	20
3.1.1	Versuchstiere und Haltung	20
3.1.2	Blut-, Plasma- und Serumgewinnung	22
3.1.3	Gewinnung von Erythrozyten	22
3.1.4	Antiserum-Herstellung	23
3.2	Methoden	23
3.2.1	Vorversuche zum Nachweis von Alloagglutininen und Allohämolysinen der Ratte: Hämagglutinationsteste, Fluoreszenztest und Hämolysetest	23
3.2.2	Nachweis von Xenohämolysinen mit einer modifizierten Hämolysen-in-Gel-Methode	28
3.3	Ergebnisse	32
3.3.1	Alloagglutinine und Allohämolysine	32
3.3.2	Xenohämolysine	32
4	Diskussion	44
5	Zusammenfassung	52
	Summary	53
6	Literaturverzeichnis	54
	Lebenslauf	67



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548818_0013

1 Einleitung

Die Standardisierung von Versuchstieren, die reproduzierbare und vergleichbare Ergebnisse ermöglichen soll, setzt eine genaue Kenntnis derjenigen Faktoren voraus, die Tierexperimente stören können (MERKENSCHLAGER, 1969). Einen bei immunologischen Experimenten unerwünschten Antikörper-Background bilden die sogenannten natürlichen Antikörper: "... Immunglobuline, die spontan, ohne erkennbaren vorherigen Antigenreiz entstanden sind und die Fähigkeit einer spezifischen Reaktion mit einem später hinzutretenden Antigen besitzen." (Zitat aus GERGELY und OTT, 1974)

Zu ihnen gehören sowohl Iso- bzw. Alloagglutinine (Blutgruppenantikörper), Allohämolysine, Xenoagglutinine als auch Xenohämolysine.

Diese "präformierten, natürlichen Antikörper" (PNAK) sind dann von Wichtigkeit, wenn Erythrozyten als Antigen oder als Träger für Haptene bei Immunisierungsversuchen eingesetzt werden sollen.

Umfassende Untersuchungen über Xenohämolysine bei einzelnen Spezies sind bisher nicht durchgeführt worden, obwohl den Xenohämolysinen, ähnlich wie den Blutgruppenantikörpern, eine Bedeutung zur Charakterisierung einzelner Stämme einer bestimmten Spezies unter definierten Haltungsbedingungen zukommen kann.

Weiterhin ist durch die quantitativ erfaßbaren Titer der Xenohämolysine die hygienische Kontrolle bei definierten Haltungsbedingungen, wie SPF- und gnotobiotische Haltungsformen sie darstellen, denkbar.

In der vorliegenden Arbeit sollen besonders die Xenohämolysine verschiedener Rattenstämme gegen Meerschweinchenerythrozyten in Abhängigkeit von Alter und Umwelt untersucht werden.

2 Literaturübersicht

2.1 "Natürliche" Antikörper (NAK)

2.1.1 Definitionen

Substanzen mit Antikörperaktivität, die im Serum von Mensch und Tier ohne vorherige apparente Infektion oder gezielte, kontrollierbare Immunisierung zu finden sind, bezeichnet man mit dem Begriff "natürliche Antikörper. Abgrenzend zu den "natürlichen" Antikörpern sollte der Begriff "natürliche Immunität" verwendet werden (MAYR, 1963). Auch die "Grundimmunität" als unspezifische Immunitätserscheinung (RAETTIG, 1952) sollte nicht im Zusammenhang mit "natürlichen" Antikörpern gesehen werden. Einmal wird mit diesen Ausdrücken eine unspezifische Resistenz auf der Basis von Phagozytose, Opsoninaktivität, Entzündung, Komplementwirkung, Präperdin, Temperaturerhöhung, pH-Milieu und fermentativen Prozessen gemeint, zum anderen eine "natürliche Immunisierung" oder "stille Feiung".

Nach STERZL und SILVERSTEIN (1967) sollte der Begriff "natürliche" Antikörper nur für diejenigen Antikörper verwendet werden, die spontan und ohne antigenen Stimulus entstehen. Diese Autoren sprechen von einer mißverständlichen Definition der "natürlichen" Antikörper, wenn sie in Zusammenhang mit einer "nonovert" Immunisierung gebracht werden können.

Dieser Definition entsprechen die von EISEN und KARUSH (1964) postulierten Antikörper, die nötig seien, um eine Immunantwort mit der gleichen Spezifität überhaupt in Gang zu setzen. Vorstellbar wären solche Antikörper als Produkte des normalen Zellstoffwechsels immunkompetenter Zellen, die permanent ihre Rezeptoren

erneuern.

Trotz dieser Definition von STERZL und SILVERSTEIN (1967) wird der Begriff "natürliche" Antikörper weiterhin vor allem für die bereits von LANDSTEINER (1901) entdeckten Isoagglutinine verwendet.

Solche Antikörper findet man im Serum von fast allen Säugetieren. Sie können gegen Zellen von Individuen mit unterschiedlichem Genotyp, die jedoch der gleichen Spezies angehören, gerichtet sein (Allohämagglutinine, Allo-hämolysine) oder gegen Individuen, die einer anderen Spezies angehören (Xeno- oder Heteroagglutinine oder -hämolysine). Isoagglutinine ist also der falsche, aber eingeführte Begriff für Alloagglutinine, da ein Isoantikörper gegen ein Individuum mit identischem Genotyp gerichtet ist; eineiige Zwillinge, Inzuchttiere und F_1 - Hybriden aus zwei Inzuchtstämmen wären zueinander "iso" (Definition von iso-, allo-, xeno- oder hetero- bei RIEGER et al., 1968).

Antikörper gegen Keime, Viren, Pilze und Parasiten müßten nach dieser Definition ebenso als Xenoantikörper eingestuft werden.

2.1.2 Vorstellungen zur Induktion der "natürlichen" Antikörper

Bereits 1903 beschreiben WRIGHT und DOUGLAS (zit. aus FOO et al., 1974) die phagozytosefördernde Eigenschaft von "Normalseren". Erst durch den Einsatz keimfreier Tiere im Versuch kann die Entstehung solcher Antikörper besser verfolgt werden. Sie werden durch Bakterienantigene der physiologischen Darmflora (WIENER, 1951; PETTENKOFER, 1960), durch Totkeime im Futter (SPRINGER et al., 1959; WOSTMANN, 1961) und durch Mitogene (RANK et al., 1969; HORNBERGER et al., 1976), die eine vom

antigenspezifischen Rezeptor unabhängige, polyklonale Immunantwort auslösen, induziert. Die Stärke der Induktion und die damit verbundenen nachweisbaren Serumtitert sind abhängig von Alter und Umwelt sowie von der genetischen Potenz eines Individuums (LODINOVA et al., 1969). Die Stimulierung von "natürlichen" Antikörpern via Darmflora, läßt sich besonders leicht mit Hilfe von gramnegativen Bakterien, insbesondere mit denjenigen der Coli-Gruppe, experimentell nachweisen (TLASKALOVA et al., 1970; LODINOVA et al., 1969).

BOLTON und CHORPENNING (1974) beschreiben "natürliche" Antikörper auch als Reaktion auf Zellmembranbestandteile von grampositiven Keimen, die Teichinsäuren (Polyglycerophosphate). Da gegen diese Antigene auch "natürliche" zellvermittelte Immunreaktionen gefunden werden, die jedoch zeitlich erst nach den entsprechenden Antikörpern auftreten, schließen die Autoren, daß in diesem Fall keine B-T-Zellkooperation stattgefunden haben kann.

Um diese Auslösemechanismen besser verständlich zu machen, sollen die grundsätzlichen Vorgänge bei einer Immunantwort dargestellt werden.

Die Instruktionstheorie von BREINL und HAUROWITZ (1930), nach der das Antigen in die Immunzelle übertritt und den Proteinsyntheseapparat antigenspezifisch prägt, wurde von BURNET'S Klonselektionstheorie abgelöst.

BURNET (1959) betrachtet die Bildung spezifischer Antikörper als Endstufe der Entwicklung eines lymphoiden Zellklons. Multipotente Knochenmarkszellen aktivieren während der Reifung zu unipotenten Immunzellen ein genetisch fixiertes, immunologisches Muster, das mit entsprechenden determinanten Gruppen eines Antigens direkt zu reagieren vermag. Diese antigenspezifische Reaktionsfähigkeit wird in Form eines Rezeptors an der Oberfläche

der Immunzelle ausgebildet. Nach Kontakt mit dem komplementären Antigen proliferiert die Immunzelle und es kommt zur Ausbildung eines unipotenten Zellklons und zur Entwicklung von Plasmazellen, die Antikörper mit nur einer Spezifität produzieren. Die Anzahl der genetisch festgelegten Klone, die verschiedene Antikörper produzieren, ist im einzelnen Individuum so groß, daß eine spezifische Immunantwort auf alle vorstellbaren Antigene, selbst wenn sie synthetischer Natur sind, gegeben ist. Die Anzahl der verschiedenen Spezifitäten wird auf 10^4 bis 10^6 geschätzt. BURNET'S Theorie besitzt, allerdings modifiziert, bis heute Gültigkeit.

Seine Auffassungen über Zellklone gegen körpereigenes Antigen, die als "verbotene Klone" während der Immunzellreifung ausgemerzt werden sollen, müssen nach heutiger Ansicht revidiert werden. Denn diese autoaggressiven "verbotenen Klone" sind potentiell in jedem Individuum vorhanden, erfahren jedoch normalerweise keine zu einer Immunreaktion führende Stimulierung. Diese wird entweder durch sogenanntes "tolerogenes" Antigen verhindert, das von den körpereigenen Zellen ständig gebildet wird, d.h. "Tolerogen" besetzt die Rezeptoren autoaggressiver immunkompetenter Zellen und führt so, ohne den Proliferationsreiz auszulösen, zu einer kompetitiven Hemmung dieser Immunzellen (WEKERLE et al., 1974) oder es kommt durch die rasche Proliferation von Zellklonen, die gegen die autoaggressiven Zellen selbst gerichtet sind, zu deren immunologischer Unterdrückung (RICHTER, 1975; HOFFMANN, 1975).

Die Ausbildung des Immunsystems wird charakterisiert von der genetischen Potenz eines Individuums, für eine Vielzahl von Antigenen Immunozyten mit entsprechenden Rezeptoren ausbilden zu können (HILSCHMANN et al., 1972).

Grundlage jeder Immunantwort ist die Stimulierung und nachfolgende Proliferation immunkompetenter Zellen, der T- und B-Lymphozyten (Übersicht bei GREAVES et al., 1974). T-Lymphozyten, die im Thymus zu unipotenten Immunzellen gereift sind, sind die Effektorzellen der zellvermittelten Immunität. Sie gelten als besonders langlebig, wie schon ihre Morphologie - großer, dichter Kern, wenig Plasma - vermuten läßt. T-Zellen tragen an ihrer Oberfläche antigenspezifische Rezeptoren, die für ihre Immunkompetenz verantwortlich sind. Auf Grund ihrer Funktion werden drei Arten von T-Zellen unterschieden:

- 1) Killerzellen = Effektorzellen der zellvermittelten Immunität,
- 2) Helferzellen (mit gegen das Trägermolekül gerichteten Spezifität) und
- 3) Unterdrückerzellen = Effektorzellen zur Zellkooperation, Auslösung und Steuerung, bzw. Unterdrückung einer Immunantwort (WIGZELL, 1976).

T-Zellen sezernieren keine Antikörper, sondern werden mit ihren antigenbindenden Rezeptoren durch direkten Kontakt oder über sogenannte T-Zellfaktoren immunologisch wirksam. Von einem Teil der T-Zellfaktoren wird vermutet, daß es sich hierbei um abgestossene Rezeptoren der T-Zellen handelt, da sie ebenfalls antigenspezifisch sind (FELDMANN, 1974).

Die Träger der humoralen Immunität sind die B-Lymphozyten, die in der Bursa bzw. dem Bursaäquivalent der Säuger (OWEN et al., 1975) zu unipotenten Immunzellen heranreifen. Auch B-Zellen tragen an ihrer Oberfläche Antigenrezeptoren. Diese sind in ihrer Struktur immunoglobulinähnlich und Träger der Antigenpezifität der immunkompetenten B-Zelle. Daneben werden noch weitere Rezeptoren mit anderer Funktion an der Oberfläche von

B-Zellen gefunden. Der wichtigste davon ist wohl der "Starterrezeptor", der die Proliferation seiner B-Zelle nach Antigenkontakt nur dann gestattet, wenn er selbst von einer Helfer-T-Zelle oder von einem T-Zell-unabhängigen Antigen (Mitogen) stimuliert worden ist (MÖLLER, 1976; HORNBERGER et.al., 1976).

Die Effektorzellen der B-Lymphozyten sind die antikörperproduzierenden Plasmazellen.

Zur Steuerung der spezifischen Immunantwort ist die Kooperation von T- und B-Zellen und einer dritten Zellart, den Makrophagen, unabdingbar. Aufgabe der Makrophagen ist es unter anderem, ein Antigen Rezeptoren immunkompetenter Zellen "optimal zu präsentieren" (KÖLSCH und MITCHISON, 1968), wobei nach engem Kontakt zwischen Antigen und passendem Rezeptor die Immunzelle durch Drehbewegungen gereizt wird (engl. "trigger") und damit der Anstoß zur Stimulierung gegeben wird. Für diese Funktion besitzen Makrophagen ebenfalls Oberflächenrezeptoren, die die Anheftung von Immunglobulinen und freien T-Zellfaktoren ermöglichen (Übersicht zur Zellkooperation bei GREAVES et al., 1974).

Als Antigen bezeichnet man Strukturen, die potentiell in der Lage sind, eine Immunantwort auszulösen. Sie bestehen aus einem großen Trägermolekül und kleinen Haptenen, "die als immundominante Gruppen einen wesentlichen Teil eines determinanten Bereiches" eines Antigens ausmachen (KABAT, 1971).

Eine Immunantwort kann von einem Antigen nur in immunogener Form und Konzentration ausgelöst werden, d.h. das Antigen muß groß genug sein (Trägermolekül) und die Dosis des Antigens muß ausreichend hoch sein.

Nach dem "einheitlichen Konzept der Immunantwort" von STERZL (1967) kommt es bei erstmaligem Kontakt immunkompetenter Zellen mit einem bestimmten Antigen zur Aus-

Lösung einer Primärantwort:

Die mit X bezeichnete immunkompetente Zelle wird vom Antigen zur Proliferation gereizt, es entstehen einige Generationen von Tochterzellen, immunstimulierte Y-Zellen, die schließlich zu Z-Zellen heranreifen (Effektorzellen, wie z.B. antikörperproduzierende Plasmazellen oder Killer-T-Zellen).

Bei einem zweiten oder weiteren Kontakt mit dem gleichen Antigen kommt es dagegen zur Sekundärantwort oder Erinnerungsreaktion:

Hier werden vom Antigen die schon zuvor ausgebildeten Y-Zellen eines entsprechenden Zellklones stimuliert und damit kommt eine Immunreaktion beschleunigt und auch stärker (Y-Zellen sind X-Zellen zahlenmäßig überlegen) zustande. Diese Y-Zellen bilden als besonders langlebige "memory cells" das sogenannte immunologische Gedächtnis.

Im Hinblick auf das immunologische Gedächtnis müssen u. U. bei der Induktion "natürlicher" Antikörper Besonderheiten angenommen werden. FOO et al. (1974), die die Opsoninaktivität von SPF-Mäusen in Abhängigkeit von der bestehenden Darmflora untersuchen, beschreiben nach Abfall der Titer infolge einer Antibiotikabehandlung einen Titeranstieg nach erneuter Darmbesiedlung, der nicht mit dem Verlauf einer anamnестischen oder Erinnerungsreaktion übereinstimmt.

2.1.3 Struktur der "natürlichen" Antikörper

Es gibt bisher keinerlei Hinweise, daß sich die "natürlichen" Antikörper, auf welche Weise sie auch induziert sein mögen, in ihrer Struktur von den Antikörpern der bekannten Immunglobulinklassen unterscheiden könnten. Sieht man von der Forderung von EISEN und KARUSH (1964) ab, daß "natürliche" Antikörper ihrer Definition nur eine Antigenbindungsstelle haben dürften, gelten die im Folgenden beschriebenen Strukturen auch für "natürliche" Antikörper.

Erste Erkenntnisse über die Struktur von Immunglobulinen, insbesondere über die "Antigenbindungsstellen" im Antikörpermolekül, bringt die Arbeit von PORTER (1950) durch die fermentative Spaltung von Kaninchengammaglobulinen mit Papain und Trypsin. Weitere Aufschlüsse erhält man durch die Arbeit von PORTER (1959). Der schematische Aufbau eines Immunglobulins wie er in Abbildung 1 auf Seite 10 dargestellt wird, stammt, leicht modifiziert, von FLEISCHMANN et al. (1963). Dieses Grundmodell eines Immunglobulins mit zwei schweren (H) und zwei leichten (L) Ketten, die über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind, wobei die leichten wie auch die schweren, bezogen auf die Aminosäuresequenz, aus einem variablen (v) und einem bzw. drei konstanten Teilen (c) bestehen, hat bis heute Gültigkeit. Hiernach setzen sich die Fab-Fragmente aus den variablen und konstanten Teilen der L-Ketten und dem variablen und je einem konstanten Teil der H-Ketten zusammen. Die Antigenbindungsstellen befinden sich in den hypervariablen Regionen der variablen Teile der L- und H-Ketten (HILSCHMANN et al., 1972). Die Bindung zwischen Fab-Fragment und Antigen wird durch elektrostatische und Van der Waalsche Kräfte bewirkt. Das Fc-Frag-

Abbildung 1: Schema eines Immunglobulin-Moleküls nach FLEISCHMANN et al. (1963), modifiziert



Schwere (H) Ketten und leichte (L) Ketten, bestehend aus den variablen (v) und konstanten (c) Teilen. Die Angriffspunkte von Papain und Pepsin sind angegeben und die Spaltprodukte mit Fab und Fc bezeichnet. Bewegungsmöglichkeit der "Gabel" in der "hinge zone". S steht für Disulfidbrücken.

ment, das die eigenen antigenen Determinanten des intakten Immunglobulins enthält, besteht aus den vier verbleibenden konstanten Teilen der schweren Ketten.

Komplementbindung und Cytotropie sind ebenfalls am Fc-Fragment lokalisiert.

Für die Unterscheidung der Immunglobulinklassen und deren Subklassen ist die Aminosäuresequenz der konstanten Teile der H-Ketten entscheidend. Die H-Ketten werden als γ beim IgG, als α beim IgA, als μ beim IgM, als ϵ beim IgE und als δ beim IgD bezeichnet. Weiterhin können die leichten Ketten durch unterschiedliche Aminosäuresequenzen ihres konstanten Teil in kappa und lambda L-Ketten und deren Subtypen unterteilt werden.

Durch elektronenmikroskopische Untersuchungen entdeckt man am Y-förmigen Molekül des IgG (FEINSTEIN und ROWE, zitiert nach GERGELY und OTT, 1975), daß sich am Trennungspunkt der "Gabel", also am H-Kettenteil, eine bewegliche Zone, die sogenannte Hinge-Region, befindet. Sie ermöglicht in gewissem Umfang den Abstand zwischen den antigenbindenden Stellen der Fab-Teile zu verändern, so daß die Anlagerung von Antigen strukturell erleichtert wird.

"Natürliche" Antikörper können verschiedenen Immunglobulinklassen angehören, nach RICE (1968) sowohl der IgG- als auch der IgM-Klasse. HINGERLE (1974) beschreibt die "natürlichen" Antikörper, hauptsächlich die älterer Tiere, als der IgM-Klasse zugehörig. ISHIZAKA et al. (1965) beschreiben Isohämagglutinine, die der IgA-Klasse zuzurechnen sind.

Im Folgenden soll ein Überblick über die chemischen und biologischen Eigenschaften der Immunglobulinklassen gegeben werden, da vor allem an Hand der biologischen Aktivität in den eigenen Untersuchungen auf die Klasse der gefundenen "natürlichen" Antikörper geschlossen wird.

Fünf Immunglobulinklassen kann man aufgrund ihrer H-Ketten unterscheiden, wobei einzelne Klassen noch in Subklassen unterteilt werden können. Die Klassenunterschiede sind nicht nur in der H-Kettenkonfiguration, sondern auch in ihren physikalischen und biochemischen Eigenschaften begründet. So hat das im allgemeinen bei einer Immunantwort zuerst auftretende IgM ein Molekulargewicht von $\sim 900\,000$ und eine Sedimentationskonstante von $\sim 19\text{ S}$.

Es stellt ein Makroglobulinmolekül dar, das aus fünf Untereinheiten, jede aus zwei H- und zwei L-Ketten bestehend, als Pentamer vorliegt. Die Untereinheiten, die über J-Ketten (engl. joining = verbindend) und Disulfidbrücken miteinander verbunden sind, sind räumlich so angeordnet, daß von den zehn eigentlich vorhandenen Antigenbindungsstellen nur fünf mit dem Antigen zu reagieren vermögen. IgM Immunglobuline zu denen z.B. auch Isoagglutinine, Kälteagglutinine und Rheumafaktoren gehören, haben agglutinierende, komplementbindende und hämolysierende Eigenschaften. Ferner können sie Phagen neutralisieren. IgM kann die Plazenta nicht passieren.

Immunglobuline der IgG-Klasse, deren Molekulargewicht $\sim 160\,000$ und deren Sedimentationskonstante $\sim 7\text{ S}$ beträgt, entsprechen räumlich den Untereinheiten der IgM-Moleküle und bestehen aus zwei L- und zwei H-Ketten. IgG bildet Präzipitate und Agglutinate, bindet Komplement, neutralisiert Viren und ist cytotrop. IgG kann die Plazenta passieren.

Das IgA mit einem Molekulargewicht von $\sim 160\,000$ ist in zwei Formen im Organismus nachweisbar; als Monomer mit einer Sedimentationskonstante von 7 S und als Dimer bzw. Polymer mit Sedimentationskonstanten von $8-18\text{ S}$. Tritt das IgA nicht als Monomer auf, so hat es neben H- und L-Ketten eine zusätzliche J-Kette, ebenso wie das IgM. Neben Serum-IgA (hauptsächlich monomere Form), kommt IgA noch in sekretorischer Form (dimere Form) im Speichel,

Kolostrum, Tränenflüssigkeit, Gastrointestinalsekret, Nasensekret und Tracheobronchialsekret vor. Dem sekretorischen IgA wird durch die sezernierenden Zellen der Schleimhäute eine Eiweißkette, die dort produziert wird, angelagert. Diese Eiweißkette wird als Transportstück (secretory piece) bezeichnet. Erst durch diese weitere Eiweißkette kommt wahrscheinlich die Enzymresistenz des Sekret-IgA zustande. Dem IgA kommt wohl in erster Linie der lokale Schleimhautschutz in den oberen Luftwegen und dem Magendarmtrakt zu. IgA besitzt die Fähigkeit zu agglutinieren, zu präzipitieren und Viren zu neutralisieren. IgA kann Komplement nicht binden und ist nicht zur Plazentapassage fähig.

Über die vierte Immunglobulinklasse, IgD, ist noch wenig bekannt. Vom IgD weiß man, daß das Molekül ebenfalls aus zwei L- und zwei H-Ketten besteht und daß erhöhte Serumwerte beim Menschen bei chronisch-infektiösen Erkrankungen zu finden sind.

Der IgE-Klasse, von ISHIZAKA et al. (1966) beschrieben, schreibt man unter anderem die Reaginaktivität zu, die bei anaphylaktischen Immunreaktionen vom Soforttyp die wesentliche Rolle spielt. Auf Grund ihrer überaus starken cytophilen Eigenschaft binden sich die IgE-Moleküle leicht an Mastzellen, reagieren dort, an der Zelloberfläche sitzend, mit dem komplementär strukturierten Antigen, zerstören damit die Mastzellmembranen und setzen so vasoaktive Substanzen (z.B. Histamin und Serotonin) frei. Immunglobuline der IgE-Klasse können nicht präzipitieren, kein Komplement fixieren und die Plazenta nicht passieren.

Übersicht zu diesem Abschnitt 2.1.3 bei STEFFEN (1968), GERGELY und OTT (1975), HUMPHREY und WHITE (1971).

2.1.4 "Natürliche" Antikörper in der Phylogenese

Je höher ein Organismus in der Evolutionsreihe steht, desto größer, komplexer, spezifischer und affiner ist sein Repertoire der Immunabwehr (GRUBER, 1975).

Diskrimination und Phagozytose als primitivste Abwehrmechanismen zeigen schon Amöben, die mit bestimmten Bakterienarten in Symbiose leben, andere dagegen phagozytieren und intrazellulär verdauen.

Zellspezialisierung zur Fremdstoffabwehr findet man bereits bei Insekten in Form ihrer Hämocyten.

Eine Erinnerungsreaktion, die zur schnelleren Abstoßung von Zweittransplantaten führt, findet man erstmals bei Anneliden. Allgemein wird diese primitive Abwehr von Fremdstoffen der niederen Tierarten von phagozytierenden Zellen getragen.

Humorale Abwehrstoffe als Folge einer speziellen Zelldifferenzierung treten bei Mollusken auf. Diese Abwehrstoffe können allerdings nicht strukturell mit den Antikörpern höherer Tiere verglichen werden. Die Spezifität dieser Stoffe gleicht der von Isohämagglutininen, ist also "natürlichen" Antikörpern verwandt.

Lymphoide Zellen schließlich lassen sich erstmals bei den primitivsten Fischen nachweisen.

Die weitere Evolution des Immunsystems führt zu dem uns vom Säuger bekannten komplexen Immunsystem mit seinem dualistischen Aufbau, zellvermittelter und humoraler Abwehr, die letztlich beide integrierende und kooperierende Bestandteile eines Helfermechanismus zur besseren Phagozytose "fremder" Stoffe sind.

Auch "natürliche" Antikörper werden im Verlauf der Phylogenese des Immunsystems gefunden. RUDIKOFF et al. (1970) beschreiben beim Ammenhai Antikörper gegen die Erythro-

zyten von Schaf, Taube und Human-Blutgruppe O und A, die bei Absättigung mit Forssman -Antigen⁺ erniedrigt werden. Die verbleibende Aktivität wird einem Antikörper anderer Spezifität zugeschrieben. Da diese Haie auch Dinitrophenyl-Protein-Komplexe präzipitieren können, werden verschiedene Möglichkeiten der Entstehung dieser "natürlichen" Antikörper erwogen:

1) DNP-Bindung und Antikörperaktivität der (IgM-) Immunglobuline liegen an verschiedenen Stellen dieser Moleküle;

2) die Antigen bindende Region ist so groß, daß neben dem Antigen noch DNP gebunden werden kann.

Als Ursache für die Entstehung werden das Erkennen eines, in der Natur vorkommenden Antigens oder ein multispezifischer Antikörper diskutiert.

2.1.5 "Natürliche Antikörper in der Ontogenese

Solange "natürliche" Antikörper vom IgM-Typ sind, findet keine Übertragung von der Mutter auf das Kind statt, sei es beim Menschen oder bei anderen Säugetieren. Da der IgM-Klasse sowohl die meisten "natürlichen" Antikörper gegen bakterielle Antigene (STERZL und SILVERSTEIN, 1967) als auch gegen allogene Erythrozyten (Isohämagglutinine) angehören (HUMPHREY und WHITE, 1971) müssen die meisten gemessenen Aktivitäten auf Eigensynthese des Individuums zurückgeführt werden. Auch Isohämagglutinine vom IgA-Typ (ISHIZAKA et al., 1965) überwinden weder die Plazenta-

⁺ Forssman-Antigen (F - Antigen, Forssman - Hapten): Ein weit verbreitetes, heterophiles Antigen, das, in Kaninchen injiziert, zur Produktion von Hämolytinen gegen Schaferythrozyten führt. Die Hämolytine werden Forssman-Antikörper genannt. (Definition nach HALLIDAY, 1971)

schanke noch können sie vom Säugling aus dem Kolostrum in den Kreislauf übernommen werden. Erst wenn "natürliche" Antikörper vom IgG-Typ sind, kann eine Übertragung von der Mutter auf das Kind angenommen werden. IgG-Typ Antikörper entstehen jedoch gegen Allogene Erythrozyten fast ausschließlich nach direkter Stimulierung mit diesen Erythrozyten (Rh-Antikörper!), so daß von "natürlichen" Antikörpern auch im weiteren Sinn der Definition nicht mehr gesprochen werden kann. Ausnahmen davon bilden die "präformierten, natürlichen Antikörper" (PNAK), die HINGERLE (1974) beim Menschen feststellen kann. Diese Xenoagglutinine sind gegen Erythrozyten von Hund, Pferd, Schwein und Kaninchen gerichtet. Auch neugeborene Kaninchen zeigen Agglutinine gegen Erythrozyten von Hund, Pferd, Schwein, Human B- und Human O-Blutgruppen. Antikörper die als "natürlich" eingestuft werden können und der IgG-Klasse angehören, beschreiben auch FREDERICK et al. (1972) bei Meerschweinchen und BOLTON und CHORPENNING (1974) bei der Ratte.

"Natürliche" Antikörper vom IgM-Typ sind beim Menschen ab dem 2. bis 4. Lebensmonat nachweisbar, Differenzen ergeben sich allerdings bei verschiedenen Blutgruppenkonstellationen Mutter-Kind (LODINOVA et al., 1969). Bei allen untersuchten Spezies (Mensch, Hund, Schwein, Kaninchen) kann HINGERLE (1976) beginnende Eigenproduktion von PNAK ab der 4. bis 6. Lebenswoche feststellen. Alle diese Autoren beschreiben eine starke Abhängigkeit der sich entwickelnden Antikörper von der antigenen Belastung, denen Mensch und Tier ausgesetzt sind. Besonders bei E.coli-Keimbisiedlungen treten Isohämagglutinine früh auf.

2.2 "Natürliche" Antikörper bei der Ratte

Die aktuellste Nomenklatur der Immunglobuline der Ratte stammt von BAZIN et al. (1974). Danach können bei der Ratte vier Klassen, IgM, IgG, IgA und IgE unterschieden werden. Die IgG-Klasse läßt sich in vier Subklassen einteilen, nämlich IgG₁, IgG_{2a}, IgG_{2b} und IgG_{2c}. Bei älterer Literatur finden sich Immunglobulinbezeichnungen, die sowohl in der Definition der zugehörigen biologischen Eigenschaften als auch in der Nomenklatur stark voneinander abweichen. Die Tabelle 1 auf Seite 35 enthält die genannten Benennungen, wichtige biologische Daten sowie Synonyma der Immunglobuline der Ratte.

Für die in dieser Arbeit erfolgende Klassifizierung der Xenohämolysine muß auf die Übertragungsverhältnisse der Immunglobuline vom Muttertier auf Feten und Säuglinge eingegangen werden:

Die fetale Transmission der Immunglobuline ist bei der Ratte, wie auch bei anderen Tieren, bezogen auf das Fc-Stück von Immunglobulinen, hochgradig selektiv, denn das Serum ungeborener Ratten enthält kein mütterliches IgM oder IgA, wohingegen mütterliches IgG gefunden werden kann (ZILLMANN, 1971; GRUBER, 1975).

Die fetale Immunglobulinübertragung kann bei der Ratte bereits am 17. Tag der Gravidität nachgewiesen werden (HALLIDAY, 1955). Zu diesem Zeitpunkt hat sich die zweischichtige Omphalopleura, die zwischen Dottersack und Uteruswand liegt, bereits zersetzt. Nach ANDERSON (1959) können maternale Antikörper mit Hilfe der Autoradiographie im Dottersackepithel bereits am 11. Tag der Trächtigkeit gefunden werden. Ein Übergang der Immunglobuline auf den Fetus kann zu diesem Zeitpunkt jedoch nicht festgestellt werden. Lediglich eine Anreicherung, die eine Selektion im Dottersackepithel vermuten läßt, wird beobachtet (NAGEL et al., 1971). Eine Übertragung über die

Chorioallantoisplazenta oder über die Gefäße der Duval-schen Krypten auf das Ungeborene wird von BRAMBELL (1958) in Erwägung gezogen, nachdem bei Ligatur der Vitellini-schen Gefäße (BRAMBELL und HALLIDAY, 1956) und der Mund-Öffnung trotzdem geringe Mengen von Immunglobulinen über-tragen werden. Die Möglichkeit der Aufnahme mütterlicher Antikörper über die fetale Haut besteht nach Angaben von Mayersbach (1958). Die Aufnahme maternalen Antikörper aus dem Kolostrum und der Milch ist ebenso Fc selektiv wie die der fetalen Resorption. Die Dauer der Immun-globulinresorption aus dem Kolostrum und der Milch durch die Säuglingsratte beträgt ca. 20 bis 23 Tage, wobei die Beendigung der Aufnahme individuell verschieden sein kann (GRUBER, 1975). Abschließend kann folgendes mit Sicher-heit festgestellt werden: IgG_{2a} und IgG_1 werden sowohl intrauterin als auch über Kolostrum und Milch bei der Ratte übertragen (GRUBER, 1975; BINAGHI und BOUSSAC-ARON, 1975), während das IgA post partum nur lokal im Darm wirkt und wie auch IgM nicht in den Blutkreislauf gelangt.

Auch auf die unterschiedliche Ausprägung der Immunglobu-linspiegel in Abhängigkeit vom antigenen Milieu soll im Hinblick auf die Haltungsbedingungen bei den eigenen Ver-suchen eingegangen werden.

Nach der Beendigung der Übertragung von maternalen Immun-globulinen werden diese entsprechend ihrer biologischen Halbwertszeit abgebaut. Das heranwachsende Tier syntheti-siert auf der anderen Seite in immer größerem Umfang sei-ne eigenen Immunglobuline. Die Steilheit des Anstiegs die-ser Eigensyntheseleistung von Antikörpern und die erreich-te Höhe des Immunglobulinspiegels sind abhängig vom Anti-genspektrum und vom Infektionsdruck, also von der ent-sprechenden Haltung-(ZILLMANN, 1971). So zeigen keimfreie Ratten deutlich niedrigere Beta- und Gammaglobulinspiegel

(GUSTAFSSON und LAURELL, 1958), während die anderen Protein-Fraktionien mit denen konventioneller Tiere fast identisch sind. In der Immunelektrophorese läßt sich im Serum keimfreier Tiere eine schwächere, aber dennoch deutliche IgG-Linie feststellen. Dieses IgG keimfreier Ratten führt man auf abgetötete Keime im Futter der Tiere zurück (WOSTMANN, 1961) und bezeichnet das induzierende Antigen als "Restantigen". Neben diesem Hauptteil des Restantigens muß man noch andere Substanzen, die entweder selbst antigen wirken oder Totkeimträger sein können, z.B. Nahrungsproteine, Einstreu u.s.w., in die Betrachtung miteinbeziehen (GRUBER, 1974).

Isohämagglutinine im Sinne von "natürlichen", also nicht auf entsprechenden Stimulus entstandenen, Antikörpern sucht bereits LUMDSEN (1938) vergeblich. BURHOE (1947), der 15 verschiedene Rattenstämme untersucht, kann bei einem einzigen Stamm Hämagglutinine finden, die die Erythrozyten aller anderen Stämme agglutinieren. KEELER (1949) teilt die Isohämagglutinine der Ratte in ein A B O - System ein, kann jedoch ohne direkte Stimulierung (Immunisierung) mit den entsprechenden Erythrozyten keine Agglutinine finden. ROBINSON (1965) beschreibt ein umfangreiches System zur Einteilung der Isohämagglutinine, die jedoch ebenfalls nicht der Definition "natürlicher" Antikörper entsprechen. Auch HEDRICH (1973) kann bei Labor- und Wildratten keine "natürlichen" Agglutinine finden. Er führt es auf eine populationsgenetische Verarmung entsprechender antigener Determinanten an den Erythrozyten der Ratten zurück. Daß diese Fehlschläge nicht mit der immunologischen Potenz von Ratten korreliert werden können, sondern Ratten sehr gut in der Lage sind, wie andere Tiere auch, "natürliche" Antikörper zu bilden, erwähnt HINGERLE (1974). Er kann erstmals bei Ratten "natürliche" Xenohämolysine finden.

3 Eigene Untersuchungen

3.1 Material

3.1.1 Versuchstiere und Haltung

Als Versuchstiere wurden männliche und weibliche SPF-Ratten der Stämme BD IX : Ivv, BD X : Ivv und BD IX/X - F₁ - Hybriden verwendet, ferner keimfreie Ivv : Sprague-Dawley-Ratten beiderlei Geschlechts.

Die SPF-Tiere, die über eine Keimfrei-Passage (Ammenaufzucht durch Sprague-Dawley-Ratten) in den SPF-Status überführt wurden, entstammten dem Inzuchtbestand und die keimfreien Ratten den Isolatoren des Institutes für Versuchstierkunde und Versuchstierkrankheiten der FU Berlin.

Das Freisein von Krankheitserregern der SPF-Tiere und die Keimfreiheit der gnotobiotischen Ratten wurde durch regelmäßige Überprüfung des hygienischen Status gewährleistet. Diese wurde auf der Grundlage der Liste von Erregern zur Spezifizierung bei SPF-Versuchstieren (GESELLSCHAFT FÜR VERSUCHSTIERKUNDE, 1972) sowie der Arbeit von OBI und JUHR (1974) zur Sterilisationskontrolle von Gnotobioten vom mikrobiologischen Labor des Institutes vorgenommen.

Die SPF-Tiere waren frei von allen in der Liste genannten Erregern, bis auf Mykoplasma pulmonis und Staphylococcus aureus. Bei den keimfreien Ratten wurde regelmäßig M. pulmonis nachgewiesen. Ein Keimfrei-Isolator war zusätzlich mit Staph. aureus kontaminiert.

Krankheiten, die auf Virusinfektionen beruhen könnten, wurden bei den Versuchstieren nicht beobachtet.

Daneben wurden aus dem SPF-Bereich in den konventionellen Tierstall des Instituts verbrachte BD IX - Ratten als Bezugstiere (Standardserumpool) und ein mit Meer-schweinchenerythrozyten immunisiertes, konventionell ge-

gehaltenes Kaninchen (Japan. Rasse) als Positivkontrolle verwendet.

Ein einziges konventionell gehaltenes Meerschweinchen (Pirbright White) diente als Erythrozyten- und Komplementspender.

Die Haltungsbedingungen der SPF-Ratten (Barriere-System) und der Keimfrei-Tiere (Trexler-Isolator) entsprachen den Empfehlungen der GESELLSCHAFT FÜR VERSUCHSTIERKUNDE (1971).

Als Alleinfutter wurde pelletiertes Altromin 1314 ff (Fa. Altromin GmbH, Lage/Lippe), das bei 134°C und 6 Min. lang autoklaviert wurde und Trinkwasser, das bei 121°C 13 Min. autoklaviert wurde, verwendet. Futter und Wasser konnten ad libitum aufgenommen werden.

Als Einstreu diente Weichholzgranulat, das bei 134°C 15 Min. lang autoklaviert wurde.

Die Verpaarung der SPF-Ratten erfolgte im Alter von 65 Tagen permanent monogam in Makrolonkäfigen Typ III. Abgesetzte Jungtiere wurden getrennt nach Geschlecht ebenfalls in Typ III Käfigen gehalten.

Der Hell-Dunkel-Lichtrhythmus bei der SPF-Haltung war auf 12 : 12 Stunden eingestellt.

Die Temperatur lag bei 22°C $\pm$ 1°C und die relative Luftfeuchtigkeit betrug 60-65%.

Der stündliche Luftwechsel war 16-18 fach.

Die konventionalisierten Ratten wurden in einem mikrobiell unkontrollierten, nicht abgeschirmten Tierraum im Institut über einen Zeitraum von über 60 Tagen nach der Entnahme aus dem SPF-Milieu gehalten.

Die Haltung des als Erythrozyten- und Komplementspender benutzten Meerschweinchens (Makrolonkäfig Typ IV, auf Weichholzgranulat) und auch die des Kaninchens (Drahtkäfig mit untergeschobenem Einstreublech) wurde unter gleichen, unkontrollierten Tierraumbedingungen durchgeführt.

Bei den Untersuchungen wurden Serum-Einzelproben von

SPF-Ratten im Alter von 0, 7, 14, 21, 42 und 84 Tagen, sowie keimfreien Tieren im Alter von über 60 Tagen und konventionalisierten Ratten im Alter von über 70 Tagen verwendet.

3.1.2 Blut-, Plasma- und Serumgewinnung

Blut:

Das Blut der Ratten wurde während einer Chloroformnarkose durch Herzpunktion mit sterilen Einmalkanülen Nr. 1 und Einmalspritzen (2 ml) gewonnen.

Die Blutentnahme beim Kaninchen erfolgte aus der Ohr- randvene mittels innen polierter Kanülen (IPO, Fa. Hauptner, Nr. 3).

Das Meerschweinchenblut wurde während einer Chloroformnarkose durch Herzpunktion gewonnen. Die Entnahme erfolgte mit Sarstedt-Monovetten 950 R EDTA-Na (Fa. Sarstedt, Nümbrecht), womit die Blutgerinnung verhindert wurde. Nach Abnahme größerer Blutmengen (über 5 ml) wurde die entsprechende Blutmenge durch subcutane Injektion von steriler physiologischer Kochsalzlösung (Fa. Pfrimmer, Erlangen) substituiert.

Serum und Plasma:

Das Blut der Ratten und des Kaninchens wurde 30 Minuten nach der Entnahme bei Zimmertemperatur stehen gelassen, während das Meerschweinchenblut sofort weiterverarbeitet wurde. Die Serum- bzw. Plasmagewinnung erfolgte durch Zentrifugieren, 10 Minuten bei 4 000 g und 18°C. Alle Seren und das Plasma wurden bis zur Verwendung bei -20°C im Tiefkühlschrank aufbewahrt.

3.1.3 Gewinnung von Erythrozyten

Nach dem Zentrifugieren des Meerschweinchenblutes wur-

de das Plasma abpipettiert und eingefroren. Die Leukozytenschicht wurde mit einer Wasserstrahlpumpe weitgehend abgesaugt. Erst dann wurden die Erythrozyten mit einer jeweils zehnfachen Menge an steriler physiologischer Kochsalzlösung vier bis fünfmal, bis zur Klarheit des Überstandes gewaschen.

3.1.4 Antiserum - Herstellung

Das Anti-Meerschweinchen-Erythrozytenserum wurde von einem Kaninchen gewonnen, das einmal mit 2 ml einer 1%igen Meerschweinchen-Erythrozytensuspension i.m. immunisiert wurde. Nach 14 Tagen erfolgte die Blutentnahme zur Antiserumgewinnung.

3.2 Methoden

3.2.1 Vorversuche zum Nachweis von Alloagglutininen und Allohämolysinen der Ratte

Die in den Vorversuchen untersuchten Seren stammten von je 10 adulten Ratten beiderlei Geschlechts aus den SPF-Inzucht-Stämmen des Institutes. In allen hier beschriebenen Versuchen wurden je Ansatz grundsätzlich Dreifachproben der einzelnen Seren bestimmt. Zur Kenntnis und zur Charakterisierung bestimmter Eigenschaften der Rattenstämme BD IX : Ivv und BD X : Ivv wurden verschiedene Untersuchungen durchgeführt, um Alloagglutinine und Allohämolysine dieser Stämme durch methodische und versuchsmäßige Variationen nachzuweisen.

Hämagglutinationsteste:

Direkte passive Hämagglutination:

In die Mikrotitrierplatten (System Cooke M220-25A, der Fa. C.A. Greiner u. Söhne, Nürtingen) wurden bei 56°C und 1 h inaktivierte BD IX- und BD X-Seren in einer

Verdünnungsreihe vorgelegt. Als Verdünnungslösung diente eine 5%ige Rinderserumalbuminlösung in steriler physiologischer Kochsalzlösung. Zu den jeweils 50 µl der geometrischen Verdünnungsreihe wurden BD IX- und BD X-Erythrozyten in 1,5%iger Suspension in konstanter Menge (50 µl) pro Verdünnungsstufe überkreuz hinzugegeben.

Variation:

Die Erythrozyten wurden vor dem Ansatz mit einem Papainpuffer nach TAYLOR und MORRIS (1970) behandelt.

Beurteilt wurden diese und die nachfolgend beschriebenen Agglutinationen nach 2 h bei Zimmertemperatur und nach 24 h bei 4°C.

Indirekte passive Hämagglutination:

Hierbei wurden die gewaschenen BD IX- und BD X-Erythrozyten überkreuz mit inaktiviertem BD IX- und BD X-Serum über einen Zeitraum von einer Stunde und 37°C sensibilisiert. Hiernach wurden die Erythrozyten gründlich gewaschen und jeweils eine 1,5 %ige Suspension hergestellt. Zur geometrischen Verdünnung in 5%iger Rinderserumalbuminlösung kamen in die Mikrotitrierplatten reihenweise ein mit BD X- und BD IX-Erythrozyten abgesättigtes Anti-Ratten-Serum⁺ vom Kaninchen, ein abgesättigtes Anti-Ratten-IgG-Serum⁺ vom Meerschweinchen und ein abgesättigtes Anti-Ratten-IgM-Serum⁺ vom Meerschweinchen in den Vorverdünnungen von 20%, 15%, 10% und 5%. Abgesättigt wurden die Seren mit jeweils 0.5 ml konzentriertem BD IX- und BD X-Erythrozyten pro ml mit anschließender Inkubation 1 h bei 37°C und 12 h bei 4°C. Die Sensibilisierung erfolgte mit 2 Teilen Serum und 1 Teil Erythrozyten.

⁺ Diese Antiseren wurden freundlicherweise von Dr.F. Gruber, Institut für Versuchstierkunde und Versuchstierkrankheiten, FU Berlin, zur Verfügung gestellt.

Die Antiseren waren vor der Absättigung ebenso wie die Seren zum Sensibilisieren eine Stunde bei 56°C inaktiviert worden. Die Zugabe der 1,5 %igen Erythrozytensuspensionen war mit 50 µl konstant.

Fluoreszenzmarkierung:

Hierbei wurde ein Anti-Ratten-IgM-Serum vom Meerschweinchen, das vorher wie bei der indirekten passiven Hämagglutination abgesättigt und inaktiviert wurde, mit Fluoreszeinisothiocyanat (FITC) markiert (laut Anweisung zur Schnellmarkierung von Proteinen mit Serva Farbstoff-Adsorbat, Fa. Serva Feinbiochemica, Heidelberg). Die gewaschenen BD IX- und BD X- Erythrozyten wurden wie bei der indirekten passiven Hämagglutination sensibilisiert und anschließend wiederum auf 1,5 % eingestellt. Auch die geometrischen Verdünnungen wurden wieder in 5 %iger BSA-Lösung vorgenommen, wobei in der Mikrotitrierplatte hier das mit FITC markierte Anti-Ratten-IgM-Serum verdünnt wurde. Die Menge der zugegebenen Erythrozytensuspension betrug ebenfalls 50 µl. Nach zwei Stunden wurde jede Verdünnungsstufe UV-mikroskopisch auf einem Objektträger beurteilt.

Hämolyserversuche:

Von den mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschenen BD IX- und BD X- Erythrozyten wurden nach dem Zentrifugieren Doppelproben mit jeweils 0.5 ml konzentrierter Erythrozyten in je zwei Reagenzgläser pipettiert. Zu den beiden Reagenzgläsern identischen Inhalts wurden 0.5 ml des inaktivierten "Kreuz-Serums", also zu den BD X-Erythrozyten BD IX-Serum und zu den BD IX-Erythrozyten BD X-Serum zugegeben. Nach einer halben Stunde wurden die zu den Erythrozyten homologen Seren als Komplementspender und inaktiviert, als Kontrollen, in Mengen von je 0.5 ml zugesetzt. 30 Minuten später wurden die Probengemische zentrifugiert, die Überstände 1 : 10 verdünnt und photometrisch bei Hg 405 nm und Hg 541 nm gemessen. Nach Abzug der Serumextinktionen

von den Probenextinktionen wurde die Extinktionsdifferenz zwischen den Proben mit homologem, inaktiviertem und homologem, nicht inaktiviertem Serum errechnet, um somit eine Aussage über den Hämolysegrad zu erhalten.

Variation:

Je 0.2 ml der Überstände der ebenso angesetzten Proben sowie die zum Probengemisch verwendeten Seren wurden mit 0.5 ml Reaktionslösung Merckotest-Hämoglobin der Fa. Merck, Darmstadt, versetzt und analog photometrisch beurteilt.

Einen Überblick der durchgeführten Vorversuche sollen die folgenden Ansatzschemen geben. Seren und Antiseren ohne weitere Kennzeichnung sind stets inaktiviert.

Hämagglutination, direkt:

BD IX - Ery + BD X - Serum → Hämagglutination ?

BD X - Ery + BD IX - Serum → Hämagglutination ?

Hämagglutination, indirekt:

BD IX - Ery + BD X - Serum → BD IX - Ery sensibilisiert

BD IX - Ery sensib. + Anti-Ratten-Serum → Hämaggl. ?

BD IX - Ery sensib. + Anti-Ratten-IgG → Hämaggl. ?

BD IX - Ery sensib. + Anti-Ratten-IgM → Hämaggl. ?

BD X - Ery + BD IX - Serum → BD X - Ery sensibilisiert

BD X - Ery sensib. + Anti-Ratten-Serum → Hämaggl. ?

BD X - Ery sensib. + Anti-Ratten-IgG → Hämaggl. ?

BD X - Ery sensib. + Anti-Ratten-IgM → Hämaggl. ?

Fluoreszenzmarkierung:

BD IX - Ery + BD X - Serum → BD IX - Ery sensib.

BD IX - Ery sensib. + Anti-Ratten-IgM/FITC → Fluoreszenz?

BD X - Ery + BD IX - Serum → BD X - Ery sensib.

BD X - Ery sensib. + Anti-Ratten-IgM/FITC → Fluoreszenz?

Hämolyseversuche:

BD IX - Ery + BD X - Serum → BD IX - Ery sensib.

+ BD IX - Serum (Kontrolle) → Hämolyse ?

BD IX - Ery + BD X - Serum → BD IX - Ery sensib.

+ BD IX - Serum nicht inakt. → Hämolyse ?

BD X - Ery + BD IX - Serum → BD X - Ery sensib.

+ BD X - Serum (Kontrolle) → Hämolyse ?

BD X - Ery + BD IX - Serum → BD X - Ery sensib.

+ BD IX - Serum nicht inakt. → Hämolyse ?

3.2.2 Nachweis von Xenohämolysinen mit einer modifizierten Hämolysen-in-Gel-Methode nach HIRAMOTO et al., (1971)

Material:

- 1) Glasplatten (54x270x3 mm)
- 2) Stanze mit 10-Loch-Muster (Fa. Gelman Instr. Company, Ann Arbor, Michigan, USA)
- 3) Temperierbarer Tisch (Fa. Colora Messtechnik GmbH, Lorch/Württ.)
- 4) Thermostat Haake KT 33 (Fa. Haakebrueder, Berlin)
- 5) 0.7 %ige Agarose (Fa. Serva Feinbiochemika, Heidelberg) in steriler physiologischer NaCl (Fa. Pfrimmer, Erlangen)
- 6) Meerschweinchen-Erythrozyten in steriler physiol. NaCl, davon 5 ml einer 10 %igen Suspension + 100 ml 0.7 %ige Agarose
- 7) Seren
Standardserum = Serumpool von 8 konventionalisierten, adulten BD IX - Ratten
Einzelseren der zu untersuchenden Tiere
Anti-Meerschweinchen-Erythrozyten-Serum vom Kaninchen als Positiv-Kontrolle
Plasma des Meerschweinchen-Erythrozyten-Spenders (1:5 verdünnt) als Komplement

Durchführung:

Vorbereitung der Hämolysen-Platten:

Die mit Aceton gereinigten Glasplatten wurden durch Eintauchen in eine 0.3 %ige Agaroselösung (90°C) mit einer Haftschrift versehen und 20 Minuten bei 120°C im Wärmeschrank getrocknet.

Zum Auftragen des Hämolyssegels wurden die Glasplatten zunächst auf den horizontal ausgerichteten Temperiertisch auf konstant 40°C mit Hilfe des angeschlossenen Thermostaten angewärmt.

Im Wasserbad wurde die vorher aufgekochte 0.7 %ige Agaroselösung auf 41°C abgekühlt und mit der entsprechenden Menge der auf 40°C vorgewärmten 10 %igen Erythrozytensuspension versetzt und durch vorsichtiges Schütteln gründlich gemischt.

Auf die warmen Glasplatten wurden pro Platte 25 ml des 41°C warmen Agarose-Erythrozyten-Gemisches aufpipettiert.

Anschließend wurden die Hämolysenplatten auf dem Temperiertisch durch den Thermostaten auf 10°C abgekühlt.

Nach dem Erstarren des Gels (Schichtdicke ca. 1.8 mm) wurden pro Hämolysenplatte 20 Reihen á 4 Löcher (Lochdurchmesser 3 mm) mit der Lochstanze eingestanzt und die Gelzylinder mit Hilfe einer an eine Wasserstrahlpumpe angeschlossenen Pasteurpipette vorsichtig ausgesaugt.

Pipettieren der Hämolysenplatten:

Die Serumproben der zu untersuchenden Ratten wurden nach einem festen Plan auf 22 Hämolysenplatten verteilt, damit auf möglichst allen Platten je eine Probe aus jeder Altersgruppe untersucht wurde. Grundsätzlich wurde jede Probe mit einer jeweils neuen Pasteurpipette bis zum optischen Verschwinden des Probeloches eingefüllt (ca. 11 µl der Probe). Während des Pipettierens lagen die Hämolysenplatten auf einem horizontal ausgerichteten Nivelliertisch.

Pro Hämolysenplatte wurden 19 Serumproben eingepipettiert und die benutzten Verdünnungsstufen (unverdünnt, 1:2, 1:4 und 1:8) des Standards über die 20 Reihen einer Hämolysenplatte nach einem festen Schema (s. Abb. 2, S. 41) eingepipettiert, so daß die Inhomogenität der gegossenen Platte als mögliche Quelle eines methodischen Fehlers berücksichtigt werden konnte.

Als Positivkontrolle wurde schließlich das Anti-Meerschweinchen-Erythrozytenserum vom Kaninchen unverdünnt und in den Verdünnungsstufen 1:2 und 1:4 eingesetzt.

Diffusion der Hämolyseplatten:

Nach dem Pipettieren wurden die Hämolyseplatten drei Tage bei 4°C in einer feuchten Kammer horizontal gelagert. Die Entwicklung der Hämolysehöfe wurde durch tägliche Kontrollen beobachtet. Am 4. Tag wurden die Hämolyseplatten zweimal eine Stunde lang bei 37°C inkubiert, wobei vor und nach der ersten Inkubation Komplement in Form von Meerschweinchenplasma nachpipettiert wurde.

Auswertung der Hämolyseplatten und Berechnung der Hämolyseaktivität im prozentualen Verhältnis zum Standardserumpool:

Im Anschluß an die zweite Inkubation wurden die Hämolyseflächen mit einem Mikrofilmlesegerät (24 fache Vergrößerung, Fa. Bell&Howell, USA) ausgewertet. Hierzu wurden der Quer- und Diagonaldurchmesser jedes einzelnen auf den Bildschirm projizierten Hämolysehofes mit einem Lineal in Millimetern gemessen. Das arithmetische Mittel aus Quer- und Diagonaldurchmesser wurde zur Berechnung der Hämolyseflächen ($= \frac{d^2}{4} \pi$) verwendet. Dieses Verfahren wurde benutzt, da nicht alle Hämolysehöfe exakt kreisrund waren.

Für jede der 22 Platten wurde aus den gruppierten 20 Hämolyseflächen des Standardserums und seiner Verdünnungen eine eigene Bezugsgerade erstellt, die nach der Formel

$$y = a + b \cdot x$$

(y: Hämolysefläche in mm²; a: y für x=0; b: Steigung der Geraden; x: Hämolyseaktivität in prozentualen Verhältnis zu Standardserumpool⁺)

⁺ Standard unverdünnt	=	100 %
" 1:2	=	50 %
" 1:4	=	25 %
" 1:8	=	12.5 %

unter Anwendung eines Programms zur linearen Regressionsanalyse berechnet wurde. Dadurch konnten Differenzen zwischen den einzelnen Hämolyseplatten, die sich beim Auftragen des Agarose-Meerschweinchen-Erythrozyten-Gemisches ergaben, bei der Berechnung der Hämolyseaktivität der Proben unberücksichtigt bleiben.

Für die 22 Bezugsgeraden errechneten sich Korrelationskoeffizienten zwischen 0.93 und 0.98 und Streuungen um die Bezugsgeraden zwischen 2.3 und 6.7 Hämolyseaktivität.

Zur Berechnung der Hämolyseaktivität der Proben wurde der mittlere Durchmesser aus den Dreifachproben eines Serums herangezogen.

Die sich ergebenden Hämolyseflächen wurden als y' in die jeweils geltenden Bezugsgeraden eingesetzt und die Hämolyseaktivität im prozentualen Verhältnis zum Standardserum nach der Formel

$$x = \frac{y' - a}{b} \quad \text{berechnet.}$$

Alle Berechnungen wurden auf einem CompuCorp 325 Scientist durchgeführt.

3.3 Ergebnisse

3.3.1 Alloagglutinine und Allohämolysine

Bei allen durchgeführten Alloagglutinationstesten konnten bei adulten SPF - BD IX - Ratten gegen BD - X - Erythrozyten durchschnittliche Titer von 1 : 16 gefunden werden, während die der BD X - Ratten gegen BD IX - Erythrozyten bei 1 : 8 lagen (s. Tab. 2, S. 36). Die Differenz hinsichtlich dieser Aktivität zwischen den beiden Rattenstämmen betrug also nur eine Verdünnungsstufe. Sensibilisierte BD X - Erythrozyten zeigten eine etwas stärkere, an der Oberfläche in einzelnen "Bündeln" auftretende Fluoreszenz als sensibilisierte BD IX - Erythrozyten bei der indirekten Fluoreszenzmarkierung mit FITC/Anti-Ratten-IgM vom Meerschweinchen.

Bei allen durchgeführten Allohämolysintesten ergab sich mit beiden benutzten Methoden für das Serum von BD IX - Tieren eine höhere Extinktionsdifferenz gegenüber Seren von BD X - Tieren (s. Tab. 3, S. 37). Die allohämolytische Aktivität der BD IX - Seren war somit ebenfalls gegenüber der der BD X - Seren geringfügig höher. Insgesamt konnten mit den in den Vorversuchen beschriebenen Methoden bei den beiden Rattenstämmen weder starke Aktivitäten von Alloagglutininen noch von Allohämolysinen gefunden werden. Auch deutliche, für eine Stammescharakterisierung brauchbare Aktivitätsunterschiede zwischen den beiden Inzuchtstämmen waren nicht festzustellen.

3.3.2 Xenohämolysine

Insgesamt wurden 414 Einzelseren - 384 Seren von SPF-Tieren unterschiedlichen Alters, 13 Einzelseren von SPF-Muttertieren und 17 Einzelseren keimfreier bzw. konta-

miniierter Sprague-Dawley-Ratten - auf ihre Xenohämolyseaktivität mit der beschriebenen modifizierten Hämolyse-in-Gel-Methode nach HIRAMOTO et al. (1971) untersucht. Die Xenohämolyseaktivität der untersuchten 384 SPF-Seren im prozentualen Verhältnis zum Standardserumpool wurde mit Hilfe des Medianwertes sowie weiterer Quantile der einzelnen Gruppen zum Ausdruck gebracht, um auch die Verteilung hämolytischer Aktivitäten innerhalb der Tiergruppen zu berücksichtigen.

Die Tabelle 4, S. 38 gibt die Anzahl der pro Altersgruppe untersuchten SPF-BD-Ratten und F_1 -Hybriden und deren Xenohämolysinaktivität wieder.

In Abbildung 3 ist der altersabhängige Anstieg der Xenohämolysinaktivität dieser Tiere dargestellt (S. 42). Unterhalb der 0-Linie der Hämolyse kann die Anzahl der nicht hämolysierenden Tiere pro Gruppe abgelesen werden. Die Anzahl hämolysierender Tiere bzw. die Medianwerte der erreichten hämolytischer Aktivität können aus den Ziffern bzw. aus der Höhe der Säule überhalb der Nulllinie abgelesen werden.

Die Hämolysetiter der BD IX - Tiere liegen erstmals in der 3. Woche sichtbar über der Null-Linie, während die der BD X - Tiere erstmals sichtbar in der 6. Woche im positiven Bereich liegen. Im weiteren Verlauf erreichen die BD X - Ratten bis zur 12. Woche in etwa die Hälfte der Hämolysinaktivität der BD IX - Tiere. Die Titer der BD IX/X - F_1 - Hybriden dagegen steigen schon in der 2. Woche deutlich an und erhöhen sich bis zur 12. Woche kontinuierlich, wo sie sich mit denen der BD IX - Ratten fast decken.

Bei allen untersuchten Neugeborenen bzw. eine Woche alten Ratten konnten keine Xenohämolysine nachgewiesen werden.

Tabelle 5 gibt die Anzahl der untersuchten Gnotobioten, deren Status, Alter, Anzahl und deren Einzelwerte hämolytischer Aktivität wieder (S. 39).

Soweit sie keimfrei waren (bzw. nur *M. pulmonis* nachweisbar), wiesen die untersuchten Sprague-Dawley-Ratten im Alter über acht Wochen keine nachweisbaren Xenohämolysintiter auf. Bei Tieren mit einer etwa drei Wochen zurückliegenden Kontamination mit *Staph. aureus* konnten Titer bis zu 50 % der Hämolyseseaktivität des Standardserumpools nachgewiesen werden, die denen gleich alter BD X - Tiere unter SPF-Bedingungen entsprachen. Tabelle 6, S. 40 gibt die Einzelwerte der Hämolyseseaktivität der Seren der über 86 Tage alten Muttertiere der 0 Tage alten BD bzw. F_1 - Hybridratten wieder. Die Titer dieser SPF-Muttertiere reichten von wenig über 52 % Hämolyseseaktivität des Standardserumpools bis zu 900 %. Derart hohe Titer konnten auch bei Wiederholungen mit verschiedenen Verdünnungsstufen dieser Seren verifiziert werden.

Immunglobuline der Ratte

Tabelle 1

Klassen und Subklassen	Molekulargewicht	S-Konstante	Synonyma	fixiert Komplement	sensibilisiert homologe Haut
IgM	1 000 000	19 S	$\gamma_M, \gamma_1^M, \beta_2^M, \beta_2^C$	ja	nein
IgG ₁	156 000	6.7 S	$\gamma_G, \gamma_1, 7 S \gamma_1$	ja	nein
IgG _{2a}	156 000	6.4 S	$\gamma_{ss}, \gamma_2, \text{IgG}_a$	ja	ja
IgG _{2b}	156 000	6.9 S	IgG_b	ja	nein
IgG _{2c}	156 000	6.7 S	γ_2		
IgA	163 000	7 - 11 S	$\gamma_A, \gamma_1^A, \gamma_2^A, \beta\text{-x-Glob.}$	nein	nein
IgE	183 000	8.5 S		nein	ja

Tabelle 2

Stamm	Mikrobieller Status	Alter	Anzahl der Tiere	direkte Hämagl.	direkte Hämagl. mit papain. Erythrozyten	indirekte Hämagl.
BD IX	SPF	adult	10	1 : 16	1 : 16	1 : 16
BD X	SPF	adult	10	1 : 8	1 : 8	1 : 8

Durchschnittliche Titer bei der direkten und indirekten Hämagglutination und bei der direkten Hämagglutination mit papainisierten Erythrozyten

Tabelle 3

Stamm	Mikrobieller Status	Alter	Anzahl der Tiere	direkte Bestimmung bei		Merckotest-Hämo-globinbestimmung	
				405 nm	541 nm	405 nm	541 nm
BD IX	SPF	adult	10	0.741	0.142	0.030	0.030
BD X	SPF	adult	10	0.728	0.123	0.024	0.023

Durchschnittliche Extinktionsdifferenzen bei den Hämolyse - Versuchen

Tabelle 4

Stamm	Mikrobieller Status	Alter in Tagen	Anzahl der Tiere	Minimum	1.Quartil	Median	3.Quartil	Maximum
BD IX	SPF	0	20	0	0	0	0	0
		7	23	0	0	0	0	0
		14	20	0	0	0	25	71
		21	20	0	0	10	44	78
		42	21	53	90	109	121	144
		84	20	0	80	103	151	164
BD X	SPF	0	56	0	0	0	0	0
		7	18	0	0	0	0	0
		14	23	0	0	0	0	0
		21	21	0	0	0	0	47
		42	20	0	0	21	48	84
		84	22	0	20	51	70	104
BD IX/X Hybrid	SPF	0	15	0	0	0	0	0
		7	14	0	0	0	0	0
		14	16	0	15	49	58	74
		21	18	0	47	55	75	87
		42	19	0	49	67	83	95
		84	18	69	91	113	128	192

Anzahl der pro Altersgruppe und Stamm untersuchten SPF-BD-Ratten und F₁-Hybriden, sowie deren Hämolyseaktivität in Prozent eines BD IX - Serumpools: Medianwerte und weitere Quartile, Minimum und Maximumwerte

Tabelle 5

Stamm	Mikrobieller Status	Alter in Tagen	Anzahl der Tiere	Hämolyse im prozentualen Verhältnis zu einem Standardserumpool, Einzelwerte
Sprague Dawley	M. pulmonis	60	12	0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0
Sprague Dawley	M. pulmonis Staph. aureus	60	5	22, 34, 38, 65, 83

Stamm, Anzahl, Alter und Status sowie Hämolyseaktivität in Prozent eines BD IX - Serum-pools der untersuchten gnotobiotischen Tiere

Tabelle 6

Stamm	Mikrobieller Status	Alter in Tagen	Anzahl der Muttertiere	Hämolyse in % eines Serumpools	Geburt der Jungen spontan	Geburt der Jungen Hysterektomie
BD IX	SPF	86	1	900	+	
			1	800		+
			1	600		+
			1	500		+
			1	108		+
BD X	SPF	86	1	52	+	
			1	59		+
			1	500		+
			1	600		+
			1	900		+
BD IX/X Hybriden	SPF	86	1	110	+	
			1	212		

Stamm, Anzahl und Status der untersuchten Muttertiere der 0 Tage alten Ratten, sowie Angaben zum Geburtsverlauf und der Hämolyseaktivität im Serum in % eines BD IX - Serumpools

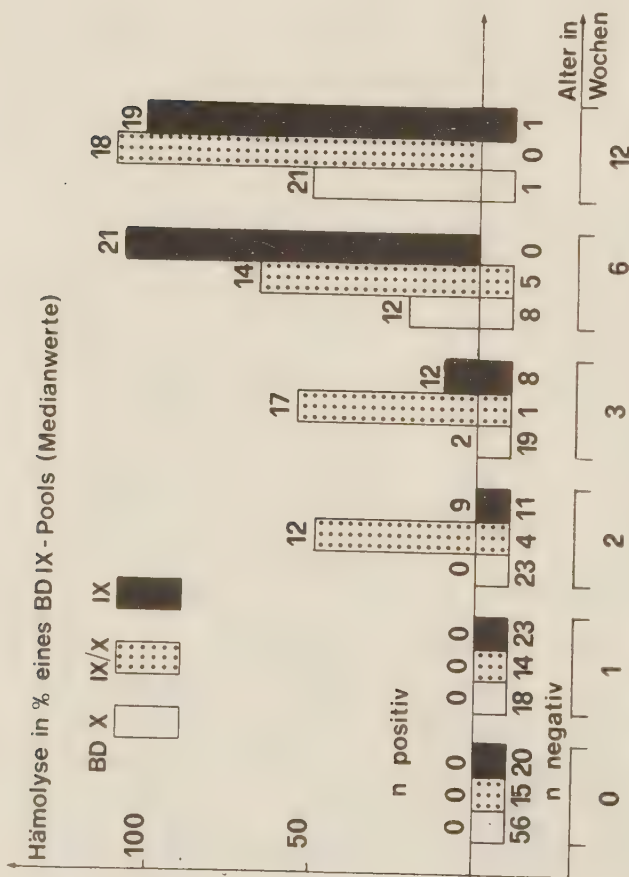
Abbildung 2

REIHE	SPALTE	1	2	3	4
1		1 ⁺	1	1	S/O ⁺⁺
2		11	11	S/2	11
3		21	S/4	21	21
4		S/8	31	31	31
5		41	41	41	S/2
6		51	51	S/4	51
7		61	S/8	61	61
8		S/O	71	71	71
9		81	81	81	S/4
10		91	91	S/8	91
11		101	S/O	101	101
12		S/2	111	111	111
13		121	121	121	S/8
14		131	131	S/O	131
15		141	S/2	141	141
16		S/4	151	151	151
17		161	161	161	S/O
18		171	171	S/2	171
19		181	S/4	181	181
20		S/8	pK ⁺⁺⁺	pK 1:2	pK 1:4

Pipettierschema der Hämolyseplatte Nr. 1

- ⁺ Laufende Nummer der Serumprobe
- ⁺⁺ S/O = Standardserumpool, S/2, S/4, S/8 seine Verdünnungsstufen
- ⁺⁺⁺ positive Kontrolle = Serum vom Anti-Meerschweinchen-Kaninchen

Abbildung 3



In Abhängigkeit vom Alter der untersuchten SPF-Ratten (BD IX, BD X und BD IX/X - F₁-Hybriden) ist hier deren Hämolyseseaktivität im prozentualen Verhältnis zum BD IX-Standardserumpool dargestellt. Die Anzahl der pro Altersstufe untersuchten Tiere ergibt sich aus der Summe der unter n positiv und n negativ aufgeführten Zahlen.

Altersabhängiger Anstieg der Hämolyseaktivität bei den untersuchten SPF-Ratten

4. Diskussion

Vereinzelte gefundene Alloagglutinititer werden auch bei Ratten in der Literatur (FRIEDBERGER und TASLAKOWA, 1929; BURHOE, 1947; OWEN, 1962; SPITERI und EYQUEM, 1965) angeführt. Bei den Ratten scheint es allerdings ohne direkte Stimulierung mit den entsprechenden Gewebezellen oder Erythrozyten kaum agglutinierende Antikörper gegen andere Rattenstämme zu geben (LUMSDEN, 1938; FRENZL et al., 1960, 1965). Die Ergebnisse der eigenen Vorversuche zum Nachweis von Alloagglutininen können also nur als Bestätigung dafür angesehen werden, daß die Stämme BD IX und BD X nicht von den anderen beschriebenen Inzuchtstämmen abweichen (HEDRICH, 1973).

Auch das Papainisieren der Erythrozyten, wie es TAYLOR und MORRIS (1970) beschrieben haben, führt bei den Erythrozyten der BD IX und BD X - Ratten nicht zu einer Auffaltung entsprechender Oberflächendeterminanten, denn die Agglutinititer steigen nicht an.

Um zu klären, ob gegen Allo-Erythrozyten gerichtete Antikörper vorhanden sind, die nicht zur Agglutination fähig sind, werden indirekte Hämagglutinationsmethoden versucht. Weder mit Anti-Ratten-, Anti-Ratten-IgG- noch Anti-Ratten-IgM-Serum werden sensibilisierte Erythrozyten mit höheren Titern agglutiniert.

Auch bei Versuchen, mit einem FITC markierten Anti-Ratten-IgM-Serum, Alloantikörper unter dem Mikroskop nachzuweisen, können keine höheren, für die Fragestellung verwertbaren Titerstufen erreicht werden.

Bei den Versuchen zum Nachweis von Allohämolysinen, den geringen Sensibilisierungsgrad der Erythrozyten durch den Einsatz von homologem Komplement in Form von Eigen-serum zu verstärken, können ebenfalls keine brauchbaren Allohämolysintiter erreicht werden.

Die Vorversuchsergebnisse insgesamt, die bei den Alloagglutinationen und der Allohämolysen nur minimale Differen-

zen zwischen den BD IX - und BD X - Rattenstämmen aufzeigten, können auf Grund einer einzigen Titerstufenerhöhung und eines stärkeren Markierungsvermögens, sowie einer gering erhöhten Hämolyseaktivität des BD IX - Serums nicht zur Charakterisierung der Rattenstämme BD IX und BD X herangezogen werden. Die einzige Aussage, die gemacht werden kann, ist die, daß die BD IX - Seren eine geringfügig erhöhte Aktivität gegenüber den BD X - Seren besitzen. Jede weitere Aussage zu den Ergebnissen schließt sich anhand der erhobenen Befunde von selbst aus, da sie ausschließlich spekulativen Charakter hätte und versuchsmäßig mit den durchgeführten Methoden nicht abgesichert werden könnte.

Daher wird angenommen, daß bei den untersuchten Ratten entweder keine Induktion von Alloantikörpern erfolgt und/oder die Dichte allotypisch differierender Determinanten an den Oberflächen der Erythrozyten nicht zum Nachweis solcher Alloantikörper ausreicht.

Eine befriedigende Antwort zur Fragestellung, nämlich die Charakterisierung der Stämme mit Hilfe der natürlichen Antikörper in Abhängigkeit von Alter und Umwelt, wäre mit diesen Ergebnissen, wie schon erwähnt, nicht möglich, ohne die Parameter und die Versuchsanordnung und damit die Fragestellung zu verändern.

Angeregt durch die persönliche Mitteilung von HINGERLE, daß Rattenserum Fremdererythrozyten lysieren könne, wurden in orientierenden Versuchen BD IX - und BD X - Rattenseren auf ihre Fähigkeit hin überprüft, Kaninchen- und Meerschweinchenerythrozyten zu hämolysieren. Hämolyseaktivität kann gegen beide heterologe Erythrozyten festgestellt werden, wobei die gesuchten Differenzen in der Hämolyseaktivität von BD IX - und BD X - Seren gegen Meerschweinchenerythrozyten auftreten.

Zur Titer-Bestimmung bietet sich die Hämolyse-in-Gel-Methode nach HIRAMOTO et al. (1971) an, weil sie leicht dem im Institut üblichen Mancini-Test-System

(radiale Immundiffusion) anzupassen ist.

Zwischen der Konzentration des benutzten Standard-Serumpools und der Hämolyseaktivität als Fläche des Hämolysehofes besteht im Ablesebereich eine lineare Beziehung, die sich mit Hilfe der linearen Regressionsanalyse als Bezugsgerade ausdrücken läßt.

Da in den orientierenden Versuchen das Nachpipettieren von Komplement in Form von Meerschweinchenplasma bei inaktivierten Rattenserum nicht zur erwarteten Hämolyse der Erythrozyten führte, werden alle Rattenserum bei der Hämolyse-in-Gel-Methode nicht inaktiviert verwendet. Nur hier kann eine Verstärkung der vorangegangenen Hämolyse bemerkt werden. Diese Verstärkung könnte in der Aufhebung eines als limitierender Faktor bei der Hämolyse fungierenden Komplementmangels liegen. RICE (1968) beschreibt zwar, daß Rattenkomplement durch Meerschweinchenkomplement ersetzt werden könne, jedoch lassen die gefundenen Ergebnisse die Vermutung zu, daß nur ein oder einige wenige Faktoren des Meerschweinchenkomplements aktiv in den Hämolyseprozess am Meerschweinchen-Erythrozyten-Ratten-Immunglobulinkomplex eingreifen können und initial Rattenkomplement anwesend sein muß. Eine andere Vermutung läge in der Annahme, daß das benutzte Meerschweinchenkomplement nicht sämtliche Komplementfaktoren enthält, so daß bei den durchgeführten Versuchen Meerschweinchenkomplement verwendet wurde, dem durch Fütterungsbedingte Einflüsse eventuell Faktoren fehlen. Diese Vermutung wird jedoch durch eine im Institut für Mikrobiologie⁺ durchgeführte Untersuchung widerlegt. Das dabei eingesetzte hämolytische System war allerdings nicht mit dem hier beschriebenen System vergleichbar.

⁺ Herrn Dr. P. Teufel sei für diese Untersuchung gedankt

Eine Verwendung anderer Tierarten als Komplementspender ist aus methodischen Gründen nicht durchführbar, da eine Hämolyseaktivität von Fremdseren die zu messende Aktivität der Rattenserum beeinflussen könnte. Als Erythrozyten- und Komplementspender dient nur ein Meerschweinchen, um Differenzen, die durch allotypische Unterschiede bedingt sein könnten, zu vermeiden.

Für die Entstehung von Xenohämolysinen können verschiedene Mechanismen diskutiert werden.

Bestimmte Substanzen, sogenannte Mitogene, können B-Zellen unabhängig von ihrem antigenspezifischen Rezeptor stimulieren. Stoffwechselprodukte und Bestandteile der Darmflora sind als solche Mitogene bekannt, z.B. Lipid A (RANK et al., 1969) und Protein A von *Staph. aureus* (FORSGREN et al., 1976). Diese kooperationsunabhängigen Mitogene können eine polyklonale, nicht spezifisch gegen nur ein Antigen gerichtete Immunantwort auslösen, da sie Immunzellen nicht über deren antigenspezifische Rezeptoren, sondern über andere Rezeptoren, die bei der Zellkooperation eine Rolle spielen, "triggern" (s. "Starterrezeptor" Kap. 2.1.2). Sollten derartige, als Mitogen wirkende Substanzen in der Darmflora unserer Ratten vorkommen, so könnten die gemessenen Xenohämolysintiter durchaus als Teil einer solchen polyklonalen Immunantwort interpretiert werden.

Dagegen ist eine spezifische Stimulierung gegen Meerschweinchenerythrozyten ebenfalls denkbar.

Erstens durch gemeinsame Determinanten an Erythrozyten und Nahrungsproteinen.

Zweitens durch gemeinsame antigene Determinanten an Meerschweinchenerythrozyten und Keimen der Darmflora.

Als Beispiel für ein solches, in der Natur weitverbreitetes Antigen muß die Teichinsäure genannt werden, da sie hitzeresistent ist und auch im autoklavierten Futter noch ihre antigene Wirksamkeit besitzt (BOLTON und CHORPENNING, 1974).

Obwohl der Immunglobulinspiegel keimfreier Tiere mit Sicherheit auf den Antigengehalt des Futters zurückgeführt werden kann, können die in dieser Arbeit gefundenen unterschiedlichen Titer von SPF- und Keimfreitieren nicht auf Nahrungsprotein zurückgeführt werden. Im Versuchsansatz bekamen alle Tiere gleichbehandeltes Futter von identischer Zusammensetzung.

Wie aus Untersuchungen bekannt ist (TLASKALOVA et al., 1970; LODINOVA et al., 1969), werden Blutgruppenantikörper des Menschen, also Alloagglutinine, durch Antigene der gramnegativen Flora, besonders von Colikeimen, induziert.

Analog zu diesen Beobachtungen wird das Entstehen der Xenohämolysine der Ratten auf das Vorhandensein der SPF-Flora bzw. auf die Kontamination ehemals keimfreier Tiere mit *Staph. aureus* zurückgeführt.

Im Gegensatz zu den von HINGERLE (1974) gemessenen Xenohämagglutininen können in den vorliegenden Untersuchungen keine Übertragungen der Xenohämolysine vom Muttertier auf Feten oder via Kolostrum auf Säuglingsratten festgestellt werden.

Aus diesem Grunde kann es sich nicht um IgG_{2a} handeln, da es die Plazenta bzw. Darmschranke der Ratte ante und post partum passiert und in größeren Mengen Säuglingsratten zur Verfügung steht. IgG₁ wird zwar ebenfalls übertragen, ist aber nur in sehr geringen Konzentrationen bei adulten Ratten vorhanden (BINAGHI und BOUSSAC - ARON, 1975), sodaß es ebenfalls nicht in Frage kommt. Auch Immunglobuline der IgA-Klasse wie auch der IgE-Klasse kommen nicht in Betracht. IgA kann Komplement nicht fixieren, das bei den geschilderten Untersuchungen eine erhebliche Rolle spielt, und IgE ist in noch schwächerer Konzentration als IgG₁ vorhanden.

Deshalb ist anzunehmen, daß diese Hämolysine der IgM - Klasse angehören.

Eine eigene Interpretation für das Zustandekommen der beschriebenen unterschiedlich hohen Titer (BD X - Ratten haben die niedrigsten, BD IX - Ratten weitaus höhere und BD IX/X - F_1 - Tiere die höchsten Xenohämolysintiter) soll anhand der in Abbildung 4, S. 43 schematisch dargestellten Modellvorstellung diskutiert werden.

Kleine Buchstaben stehen in Abb. 4 als Symbol für strukturell verschiedene antigene Determinanten an der Oberfläche von Keimen der Darmflora. An der Oberfläche des Meeresschweinchenerythrozyten (guineapig-red-blood-cell = GPRBC) sind unter anderem einige antigene Determinanten vorhanden, die wegen der Übereinstimmung ihrer Struktur mit antigenen Determinanten von Keimen der Darmflora mit den gleichen kleinen Buchstaben (a, c, d, k und f) bezeichnet werden.

Die unter Bezeichnung der Stämme bzw. der F_1 - Hybriden eingezeichneten großen Kreise stellen die durch Faktoren der Genetik geprägte Anzahl potentiell antikörperproduzierender Zellklone dar.

Für die einzelnen Zellklone, die jeweils Antikörper nur einer Spezifität produzieren, stehen die kleinen Kreise, von denen diejenigen, die durch eine antigene Determinante der Keime der Darmflora zur Antikörperproduktion stimuliert werden, den entsprechenden großen Buchstaben als Symbol tragen. Zwischen den Stämmen BD IX und BD X gibt es hiernach Stammesunterschiede in der Stimulierbarkeit durch Antigene der Darmflora.

Einige antigene Determinanten der Darmflora - g, i, l, m und o - stimulieren bei keinem der beiden Stämme eine Antikörperproduktion. Die antigenen Determinanten a und b dagegen führen bei beiden Rattenstämmen zur Produktion von Antikörpern. Die antigenen Determinanten c, d, f, k und n stimulieren nur Zellklone von den BD IX - Tieren, die antigenen Determinanten e und h nur Zellklone der BD X - Tiere. Die BD IX/X - F_1 - Hybriden produzieren Antikörper gegen alle die Antigene, die bei den Eltern

tieren ebenfalls zur Stimulierung fähig sind: a, b, c, d, f, h, k und n.

Hämolytische Aktivität gegen Meerschweinchenerythrozyten können nur diejenigen Antikörper entfalten, die strukturelle Antigene an der Oberfläche von Meerschweinchenerythrozyten vorfinden (s. nachfolgende Tab. 7).

Tabelle 7

Stamm	Von der Darmflora induzierte Antikörper. Antikörper mit hämolytischer Aktivität gegen GPRBC unterstrichen
-------	---

BD IX	Anti - <u>A</u> , B, <u>C</u> , <u>D</u> , <u>F</u> , <u>K</u> , N
-------	--

BD IX/X

F ₁ -Hybr.	Anti - <u>A</u> , B, <u>C</u> , <u>D</u> , E, <u>F</u> , <u>H</u> , <u>K</u> , N
-----------------------	--

BD X	Anti - <u>A</u> , B, E, <u>H</u>
------	----------------------------------

Hiermit wird die stärkste hämolytische Aktivität im Serum der BD IX/X - F₁ - Hybriden, die schwächste Hämolyseaktivität dagegen im Serum der BD X - Ratten begründet.

Die hohen Titer der Muttertiere der 0 Tage alten Tiere können im Rahmen dieser Arbeit nicht diskutiert werden, denn sie rechtfertigen umfangreiche Untersuchungen zur Klärung dieses Phänomens.

Die möglichen Interpretationen über das Zustandekommen von Xenohämolysinen der Ratte, einmal Stimulierung durch unspezifische, polyklonale Mitogene, andererseits Stimulierung durch antigene Determinanten, die Darmflora und Meerschweinchenerythrozyten gemeinsam haben, führen zu

der Erkenntnis, daß Immunisierungsversuche mit einer ganzen Reihe von Antigenen auch bei SPF - Tieren nicht zu einer echten Primärantwort führen. Dies erschwert die Aufklärung grundsätzlicher immunologischer Fragestellungen in vivo, wie z.B. die Mechanismen der Zellkooperation bei der Auslösung der humoralen Immunantwort.

Aus diesem Grunde ist für solche Untersuchungen der Einsatz von Keimfrei-Tieren erforderlich und dringendst zu empfehlen.

5 Zusammenfassung

Durch verschiedene Versuchsanordnungen wurden die sogenannten "natürlichen" Antikörper bei BD IX - und BD X - Ratten, sowie BD IX/X - F_1 - Hybriden aus dem SPF - Milieu und gnotobiotischen Sprague-Dawley-Ratten unter besonderer Berücksichtigung der Xenohämolysinaktivität gegen Meerschweinchenerythrozyten in Abhängigkeit von Alter und Umwelt untersucht.

Bei den durchgeführten Untersuchungen auf Alloagglutinine und Allohämolysine konnten keine befriedigenden Ergebnisse erzielt werden. Festgestellt werden konnte nur, daß die Aktivität der BD IX - Seren gegenüber den BD X - Seren geringfügig erhöht war.

Erst bei den Untersuchungen auf Xenohämolysine konnten höhere Titer gefunden werden, die sich, abhängig vom Stamm, Alter und der Umwelt der verwendeten Tiere, als Parameter zur Charakterisierung dieser Stämme eignen.

Es können folgende Aussagen gemacht werden:

- 1) Neugeborene Tiere weisen keine Xenohämolysinaktivität auf, also findet keine Mutter-Kind-Passage statt.
- 2) Xenohämolysinaktivität konnte bei den BD IX/X - F_1 - Hybriden schon in der 2. Woche, bei den BD IX - Tieren erstmals in der 3. Woche und bei den BD X - Tieren erst in der 6. Woche nachgewiesen werden.

Die Titer der BD X - Tiere liegen in der 12. Lebenswoche nur etwa halb so hoch wie die der BD IX - Tiere und der BD IX/X - F_1 - Hybriden.

- 3) Keimfreie Tiere haben, sofern ihr mikrobieller Status nur *M. pulmonis* aufweist, keine Xenohämolysintiter.

Die gefundenen Ergebnisse bekräftigen die Ansicht, daß natürliche Antikörper durch Keime der Darmflora induziert werden.

Summary

By several experimental arrangements the so called "natural" antibodies in BD IX and BD X rats as well as in BD IX/X-F₁-hybrids of the SPF environment and in the gnotobiotic Sprague-Dawley rats with special regard to the xeno-hemolysin-activity against guinea-pig erythrocytes in function of age and environment were studied. From the experiments that were carried out on alloagglutinins and allohemolysins no satisfactory result was obtained. There was only stated that the activity of the BD IX - sera as against the BD X - sera was raised insignificantly.

Only in the experiments on xenohemolysins higher titers were found, which in function of the strain, age and environment of the animals that were used, are suited to be parameters to the characterization of these strains. Following statements could be made:

- 1) Newborn animals don't have any xenohemolysin titers, which means that there is no passage from mother to young.
- 2) The xenohemolysin activity was detected in the BDIX/X-F₁-hybrids already in the second week of age, in the BD IX animals during the third week and in the BD X - animals first during the sixth week.
The titers of the BD X animals in the twelfth week of age are only half as high as these of the BD IX animals and these of the hybrids.
- 3) Germfree animals don't have any xenohemolysin titers, as far as their microbiological status only shows *M. pulmonis*.

The results which were discovered confirm the view that "natural" antibodies are induced by the intestinal flora.

6 Literaturverzeichnis

ANDERSON, J.W.

The placental barrier to gamma-globulins in the rat.
Amer.J.Anat. 104 (1959), 403-429

BAZIN, H., A. BECKERS und P. QUERIJEAN

Three classes and four (sub) classes of rat immuno-
globulins. IgM, IgA, IgE and IgG₁, IgG_{2a}, IgG_{2b}, IgG_{2c}.
Eur.J.Immunol. 4 (1974), 44-48

BINAGHI, R.A. und Y. BOUSSAC-ARON

Isolation and properties of 7S rat immunoglobulin
different from IgG.
Eur.J.Immunol. 5 (1975), 194-197

BOLTON, R.W. und F.W. CHORPENNING

Naturally occurring cellular and humoral immunity
to teichoic acid in rats.
Immunology 27 (1974), 517-524

BRAMBELL, F.W.R.

The passive immunity of the young mammal.
Biol.Rev. 33 (1958), 488-527

BRAMBELL, F.W.R. und R. HALLIDAY

The route by which passive immunity is transmitted
from mother to foetus in the rat.
Proc.Roy.Soc.Ser.B 145 (1956), 179-185

BREINL, F. und F. HAUROWITZ

(1930) zitiert n. Steffen, C.,
Allgemeine und experimentelle Immunologie und
Immunpathologie.
Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1968), 92

BURHOE, S.O.

Blood groups of the rat (*rattus norvegicus*) and their inheritance.

Proc.Nat.Acad.Sci. US 33 (1947), 102-109

BURNET, F.M.

The clonal selection theory of acquired immunity.

Cambridge University Press, London/New York (1959)

EISEN, H.N. und F. KARUSH

Immune tolerance and an extracellular regulatory role for bivalent antibody.

Nature 202 (1964), 677-682

FEINSTEIN und ROWE

zitiert n. Gergely J. und H.H. Ott,

Immunglobuline und Immunopathien

Gustav Fischer Verlag, Stuttgart (1975), 40

FELDMANN, M.

T cell suppression in vitro

I. Role in regulation of antibody responses.

II. Nature of specific suppressive factor.

Eur.J.Immunol. 4 (1974), 660-674

FLEISCHMANN, I.B., R.R. PORTER und E.M. PRESS

The arrangement of the peptide chains in gammaglobulin.

Biochem.J. 88 (1963), 220-228

FOO, M.C., A. LEE und G.N. COOPER

Natural antibodies and the intestinal flora of rodents.

Aust.J.Exp.Biol.Med.Sci. 52 (1974), 321-330

FORSQREN, A., A. SVEDJELUND und H. WIGZELL

Lymphocyte stimulation by protein A of Staphylococcus aureus.

Eur.J.Immunol. 6 (1976), 207-213

FREDERICK, G.T., R.A. HOLMES und F.W. CHORPENNING

Naturally occurring cell-mediated immunity to purified glycerol-teichoic acid antigen in guinea pigs.

J.Immunol. 109 (1972), 1399-1401

FRENZL, B., R. BRDICKA, V. KREN und O. STARK

Erythrocyte B1 antigen in inbred rat strains.

In: Matousek, J. (Hrsg.), Blood groups of animals.

Proceedings of the 9th European animal blood group conference, Prague, 1964,

Publishing House, Czechoslovak Acad.Sci., Prague, (1965), 197-203

FRENZL, B., V. KREN und O. STARK

Attempt to determine blood groups in the rats.

Folia Biol., Praha, 6 (1960), 121-126

FRIEDBERGER, E. und T. TASKALOWA

Über Blutgruppen bei der zahmen und wilden Ratte.

Z. Immunitätsforsch.Exp.Ther. 59 (1929), 271-276

GERGELY, J. und H.H. OTT

Immunglobuline und Immunopathien.

Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, (1975), 43-44, 76

GESELLSCHAFT FÜR VERSUCHSTIERKUNDE

Planung und Einrichtung von Versuchstierbereichen tierexperimentell tätiger Institutionen.

Empfehlungen des Ausschusses für Standardisierung von Methoden in der Versuchstierhaltung.

Zürich, (1971)

GESELLSCHAFT FÜR VERSUCHSTIERKUNDE

Liste von Erregern zur Spezifizierung bei SPF- Versuchstieren.

Empfehlungen des Ausschusses für SPF- und gnotobiotische Versuchstiere.

Veröff.d.Ges.f. Versuchstierkunde, Nr.2, Zürich, (1972)

GREAVES, M.F., J.J.T. OWEN und M.C. RAFF

T and B lymphocytes.

Origins, properties and roles in immune response.

Excerpta medica Amsterdam,

Amer.Elsevier Publishing Co., Inc. New York, (1974),
81-93, 149-169

GRUBER, F.

Auf dem Weg zur Antigenfreiheit.

Tierlaboratorium, (1974), 93-100

Hrsg. von der Fachrichtung Versuchstierkunde und
Versuchstierkrankheiten der FU Berlin

GRUBER, F.

Immunologie der Versuchstiere.

Schriftenreihe Versuchstierkunde 3 (1975), 55-58

Verlag Paul Parey, Berlin/Hamburg

GUSTAFSSON, B.E. und C.-B. LAURELL

Gamma-globulins in germ-free rats.

J.Exp.Med. 108 (1958), 251-257

HALLIDAY, R.

Prenatal and postnatal transmission of passive
immunity to young rats.

Proc.Roy.Soc.Ser.B 144 (1955), 427-430

HALLIDAY, W.J.

Glossary of immunological terms.

Butterworth & Co., Publisher Ltd. (1971), 19

HEDRICH, H.J.

Zur immungenetischen Charakterisierung einiger
Rattenstämme.

Diss. med. vet., Hannover (1973)

HILSCHMANN, N., H. PONSTINGL, S. WATANABE, H.U. BARNIKOL,
K. BACZKO, M. BRAUN und W. LEIBOLD

Genetic controll of immunoglobulin structure.

In: Immunoglobulins, cell bound receptors and
humoral antibodies.

Hrsg. Ballieux, R.E., M. Gruber und H.G. Seijen,
North-Holland/Amer. Elsevier Verlag (1972) 31-48

HINGERLE, M.

Orientierende Untersuchungen über Entwicklung,
Immunglobulinklasse und Auslösemechanismus der
präformierten natürlichen Antikörper bei Mensch
und höheren Säugern.

Diss. Med., München (1974)

HINGERLE, M., F. GRUBER, G. RUCKDESCHL, C. HAMMER und
W. BRENDL

Preformed natural antibodies.

14. Wissenschaftliche Tagung der Gesellschaft für
Versuchstierkunde, Berlin, (1976), Abstracts

HIRAMOTO, R.N., J.R. MCGHEE, C.D. HURST und N.M. HAMLIN

A study of the single radial hemolysis in gel system
I, II.

Immunochemistry 8 (1971), 355-373

HOFFMANN, G.W.

A theory of regulation and self-nonsel self discrimination in immune network.

Eur.J.Immunol. 5 (1975), 638-647

HORNBERGER, M., W.R. RANK und L. GÜRTLER

Characterization of the lipid A-mutation in the mouse strain C3H/HeJ.

14. Wissenschaftliche Tagung der Gesellschaft für Versuchstierkunde, Berlin (1976), Abstracts

HUMPHREY, J.H. und R.G. WHITE

Kurzes Lehrbuch der Immunologie.

Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1971), 94-120

ISHIZAKA, K., T. ISHIZAKA, E.H. LEE und H. FUDENBERG

Immunochemical properties of human γ A isohemagglutinin. I. Comparisons with γ G and γ M-globulin antibodies.

J.Immunol. 95 (1965), 197-208

ISHIZAKA, K., T. ISHIZAKA und M. HORN BROOK

Physio-chemical properties as a carrier of reagenic activity.

J.Immunol. 97 (1966), 75-85

KABAT, E.A.

Einführung in die Immunchemie und Immunologie.

Springer Verlag, Berlin/Heidelberg/New York (1971), 9-25

KEELER, C.E.

Blood groups of the rat. Haematology of the rat - methods and standards.

In: The rat in laboratory investigation.

Hrsg. Farris, E.J. und J.O. Griffith, jr.

Hafner Publishing Company, New York, 2. Auflage (1949), 415-420

KÖLSCH, E. und N.A. MITCHISON

The subcellular distribution of antigen in macrophages.

J.Exp.Med. 128 (1968), 1059-1079

LANDSTEINER, K.

Über Agglutinationserscheinungen normalen menschlichen Blutes.

Wien.Klin.Wochenschr. 14 (1901), 1132-1134

LODINOVA, R., H. TLASKALOVA, V. JOUJA und A. LANC

Die Entwicklung der Isoagglutinine bei Kindern in den ersten Lebensmonaten und die Beeinflussung ihrer Bildung durch Besiedlung des Darmtraktes mit dem E.coli Stamm O86.

Z.Immunitätsforsch., Allergie u. klin. Immunologie 137 (1969), 403-416

LUMDSEN, T.

Agglutination tests in the study of tumor immunity, natural and acquired.

J.Cancer 32 (1938), 395-417

MAYR, A.

Resistenz und Immunität.

Berl.Münch.tierärztl.Wochenschr. 76 (1963), 417-421

MAYERSBACH, H.

Zur Frage des Proteinüberganges von der Mutter zum Foeten. I. Befunde an Ratten am Ende der Schwangerschaft.

Z.Zellforsch. 48 (1958), 479-504

MERKENSCHLAGER, M.

Definierte Keimbesiedlung als eine Standardisierungsmaßnahme bei Versuchstieren.

Berl.Münch.tierärztl.Wochenschr. 82 (1969), 361-365

MÖLLER, G.

Properties and function of B cells.

27. Mosbacher Kolloquium d. Ges. für Biol. Chemie
The immune system. Abstracts, 1976

Hoppe-Seylers Z.Physiol.Chemie 357 (1976), 618

NAGEL, K.H., B. ERNST, C. ENGELMANN und W. BOSTELMANN

Beitrag zum diaplazentaren Stofftransport bei Ratten mit markierten Makromolekularsubstanzen. Histologische, fluoreszenzmikroskopische u. elektronenoptische Untersuchungen.

Beitr.Path. 143 (1971), 111-125

OBI, S., N.C. JUHR

Aspekte der Sterilisation und Sterilitätskontrolle in der Gnotobiologie.

Tierlaboratorium (1974), 158-174

Hrsg. von der Fachrichtung Versuchstierkunde und Versuchstierkrankheiten der FU Berlin.

OWEN, J.J.T., M.C. RAFF und M.D. COOPER

Studies on the generation of B-lymphocytes in the mouse embryo.

Eur.J.Immunol. 5 (1975), 468-473

OWEN, R.D.

Earlier studies of blood groups in the rat.
Ann.N.Y.Acad.Sci. 97 (1962), 37-42

PETTENKOFER, H.J., W. MAASSEN und R. BICKERICH
Antigengemeinschaft zwischen menschlichen Blut-
gruppen und Enterobacteriaceen.
Z.Immunitätsforsch. 119 (1960), 415-429

PORTER, R.R.

The formation of a specific inhibitor by hydrolysis
of rabbit antiovalbumin.
Biochem.J. 46 (1950), 479-484

PORTER, R.R.

The hydrolysis of rabbit γ -globulin and antibodies
with crystalline papain.
Biochem.J. 73 (1959), 119-126

RANK, W.R., U. FLÜGGE und R. DiPAULI

Inheritance of the lipoid A-induced 19 S-plaque-
forming-cell-response in mice: evidence for three
antigen-recognition-mechanisms.
Antibody workshop meeting, Kronberg, 1969.
Behringwerk-Mitteilungen Heft 49 (1969), 222-229

RAETTIG, H.

Die Grundimmunisierung als unspezifische Immunitäts-
erscheinung und ihre epidemiologischen Auswirkungen.
Zbl.Bakt.,Orig. 158 (1952), 161-168

RICE, C.E.

Comparative serology of domestic animals.
Advances Vet.Sci. 12 (1968), 105-162

RICHTER, P.H.

A network theory of the immune system.

Eur.J.Immunol. 5 (1975), 350-354

RIEGER, R., A. MICHAELIS und M.M. GREEN

A glossary of genetics and cytogenetics.

3. Auflage, Springer Verlag Berlin/Heidelberg/

New York (1968), 14, 217, 252

ROBINSON, R,

Genetics of the Norway rat.

International series of monographs in pure and
applied biology.

Division Zoology 24 (1965), 315-324

RUDIHOFF, S., E.W. VOSS und M.M. SIGEL

Biological and chemical properties of natural
antibodies in the nurse shark.

J.Immunol. 105 (1970), 1344-1352

SPITERI, M. und A. EYQUEM

Studies on erythrocytic factors in rats.

In: Matousek, J. (Hrsg.), Blood groups of animals.
Proceedings of the 9th European animal blood group
conference, Prague, 1964.

Publishing House, Czechoslovak Acad. Sci., Prague
(1965), 205-209

SPRINGER, G.F., R.E. HORTON und M. FORBES

Origin of anti-human blood group B agglutinins in
germfree chicks.

Ann.N.Y.Acad.Sci. 78 (1959), 272-275

STEFFEN, C.

Allgemeine und experimentelle Immunologie und
Immunpathologie.

Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1968), 39-61

STERZL, J.

Factors determining the differentiation pathways
of immunocompetent cells.

Cold Spring Harbor Symp. 32 (1967), 493-506

STERZL, J. und A.M. SILVERSTEIN

Development of natural antibodies.

In: Developmental aspects of immunity.

Advances Immunol. 5 (1967), 375-380

TAYLOR, H.R. und P.J. MORRIS

A simple micro method for detecting isohaemaggluti-
nins in rats using papainized red blood cells.

Aust.J.Exp.Biol.Med.Sci. 48 (1970), 245-247

TLASKALOVA, H., V. KAMARYTOVA, L. MANDEL, L. PROKESOVA,
J. KRUML, A. LANC und I. MILLER

The immune response of germ-free piglets after per-
oral monocontamination with living E.coli strain O86.

Folia Biol., Praha, 16 (1970), 177-187

WEKERLE, H., I.R. COHEN und M. FELDMANN

Selbst-Toleranz und Autoimmunität.

Ein neues Konzept und seine Bedeutung.

Dtsch.med.Wochenschr. 99 (1974), 1734-1739

WIENER, A.S.

Origin of naturally occurring hemagglutinins and
hemolysins: A review.

J.Immunol. 66 (1951), 287-295

WIGZELL, H.

T lymphocytes.

27. Mosbacher Kolloquium d. Ges. für Biol. Chemie

The immune system. Abstract, 1976

Hoppe-Seylers Z. Physiol.Chemie 357 (1976), 618

WOSTMANN, B.S.

Recent studies on the serum proteins of germfree
animals.

Ann.N.Y.Acad.Sci. 94 (1961), 272-283

WRIGHT, A.E. und S.R. DOUGLAS

(1903) zitiert nach Foo, M.C., A. Lee und G.N. Cooper,
Natural antibodies and the intestinal flora of rodents.
Aust.J.Exp.Biol.Med.Sci. 52 (1974), 321

ZILLMANN, U.

Der Immunglobulin G_{2a}-Spiegel bei Sprague-Dawley-
Ratten in Abhängigkeit von Alter und Haltung.

Diss. med. vet., Berlin (1971)

An dieser Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. M. Merkschlager für die Überlassung des Themas und die Arbeitsmöglichkeiten im Institut bedanken.

Herrn Ass.Prof. Dr. Franz Gruber und Herrn Dr. Lutz Dietzel gilt mein besonderer Dank für ihre tatkräftige Unterstützung und ihre Bereitschaft, jederzeit offene Fragen zu besprechen und zu klären.

Fräulein U. Laska und Frau E. Loyd danke ich für ihre Hilfe bei den Laboruntersuchungen.

Lebenslauf

Am 14.7.1949 wurde ich, Jörg Werner Moritz Jänicke, als Sohn des Arbeiters Werner Jänicke und seiner Ehefrau Evelyn, geborene Frommhold, in Berlin geboren.

Nach den Grundschuljahren kam ich 1962 auf die Freiherr-vom-Stein-Oberschule (Gymnasium) in Berlin-Spandau und legte dort am 11.2.1969 die Reifeprüfung ab.

Im Wintersemester 1969 begann ich mit dem Studium der Veterinärmedizin an der Freien Universität Berlin und legte im Mai 1972 die Tierärztliche Vorprüfung ab.

Am 15.4.1975 bestand ich den 3. Abschnitt der Tierärztlichen Prüfung und erhielt am 28.4.1975 die Approbation als Tierarzt.

Zur Anfertigung meiner vorliegenden Dissertation arbeitete ich vom Juni 1974 bis August 1976 im Institut für Versuchstierkunde und Versuchstierkrankheiten der Freien Universität Berlin.

